



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SALVADOR LIMA BRITO JÚNIOR

**FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA: IDENTIFICAÇÃO DE UM  
COMPOSTO VOLÁTIL ASSOCIADO AO PATOSSISTEMA  
HOSPEDEIRO (*GLYCINE MAX*) E O ESTUDO DA  
INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL COM *PHASEOLUS LUNATUS***

---

Londrina  
2013

SALVADOR LIMA BRITO JÚNIOR

**FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA: IDENTIFICAÇÃO DE UM  
COMPOSTO VOLÁTIL ASSOCIADO AO PATOSSISTEMA  
HOSPEDEIRO (*GLYCINE MAX*) E O ESTUDO DA  
INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL COM *PHASEOLUS LUNATUS***

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor

Londrina  
2013

SALVADOR LIMA BRITO JÚNIOR

**FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA: IDENTIFICAÇÃO DE UM  
COMPOSTO VOLÁTIL ASSOCIADO AO PATOSSISTEMA  
HOSPEDEIRO (*GLYCINE MAX*) E O ESTUDO DA INTERAÇÃO  
INCOMPATÍVEL COM *PHASEOLUS LUNATUS***

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor  
EMBRAPA Soja - Londrina

---

Ney Sussumu Sakyama  
Universidade Federal de Viçosa - UFV

---

Dr. Thales Lima Rocha  
EMBRAPA CENARGEM - Brasília

---

Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira  
EMBRAPA CAFÉ – Brasília

---

Clara Beatriz Hoffmann Campo  
EMBRAPA Soja – Londrina

Londrina, 28 de fevereiro de 2013.

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B862f Brito Júnior, Salvador Lima.

Ferrugem asiática da soja : identificação de um composto volátil associado ao patossistema hospedeiro (*Glycine max*) e o estudo da interação incompatível com *Phaseolus lunatus* / Salvador Lima Brito Júnior. – Londrina, 2013.  
91 f. : il.

Orientador: Ricardo Vilela Abdelnoor.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Ferrugem da soja (Doença) – Teses. 2. Genética vegetal – Teses. 3. Soja – Doenças e pragas – Teses. 4. Plantas – Resistência – Teses. 5. Feijão-lima – Teses. I. Abdelnoor, Ricardo Vilela. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 581.169

## **DEDICATÓRIA**

Dedico à minha família, meu alicerce, e em especial à minha esposa Lívia Maria Nogueira Brito, que com amor, dedicação e companheirismo, esteve presente em todos os momentos dessa conquista.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar saúde, sabedoria e força para seguir em frente e sempre me proteger, iluminando o meu caminho.

Aos meus pais, Sr. Salvador Lima Brito e Sra. Ises da Aparecida Nunes, que nunca mediram esforços para me dar uma boa educação e me apoiar em todas as minhas decisões. A eles, essa conquista é dedicada com todo amor e carinho.

Ao meu irmão, Guilherme Emanuell Nunes Lima Brito, um grande amigo com qual sempre tive o prazer de compartilhar grandes momentos. Também dedico a você essa conquista.

À minha esposa, Lívia Maria Nogueira Brito, uma companheira e amiga que sempre esteve presente, nos bons momentos e naqueles à qual algumas barreiras foram impostas. Juntos, seguimos em frente e superamos todos os obstáculos. Obrigado pelo seu amor incondicional. Simplesmente te amo.

Aos meus sogros Sr. Salviano José Nogueira e Sra. Sônia Regina Nogueira, obrigado por todo amor e carinho.

Ao meu cunhado Anselmo Nogueira, pelos bons momentos. Obrigado pelo apoio.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor, pelos seus ensinamentos, respeito, honestidade e dedicação. Grande parte da minha formação acadêmica e pessoal é espelhada em seus ensinamentos.

Às minhas coorientadoras, Dra. Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães e Dra. Clara Beatriz Hoffmann Campo, pelos ensinamentos, amizade e ajuda sempre disponibilizada. Seus ensinamentos e amizade serão por toda vida.

Ao Dr. Ney Sussumu Sakiyama, Dr. Thales Lima Rocha e Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira pela participação na banca examinadora e inestimável contribuição.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia e Bioinformática da Embrapa Soja, pelo apoio sempre disponibilizado. Em especial a Silvana Marin, César Vieira e Vera Lúcia, o meu muito obrigado.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia e Bioinformática da Embrapa Soja. Vocês proporcionaram momentos inesquecíveis. Obrigado por tudo. Em especial a Aguida Morales, Valéria Lopes, Cyanara Romero e Lizandra Catelli; sem o apoio de vocês esse trabalho não seria realizado. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. John Pickett, Dr. Mike Birkett, Dr. Keith Chamberlain e Dr. Jonathan Jones pelo intercâmbio científico e amizade. Obrigado por me receberem e proporcionarem um crescimento profissional inestimável.

Aos meus professores e amigos Brian e Susan Smith, pela grande amizade.

Aos meus amigos da Southwood Court, em Harpenden; em especial a Victor Pyrlo e Maike Rossmann.

Aos meus amigos Elton Gargioni, Leonardo Ribeirinho e Wilson Rocha, que se tornaram grandes irmãos.

À Embrapa Soja e ao Rothamsted Research, pelo aperfeiçoamento profissional e por tornar possível a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina, e em especial ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade oferecida para realização deste curso. O meu muito obrigado e admiração.

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que, direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

BRITO JÚNIOR, Salvador Lima. **Ferrugem Asiática da Soja: Identificação de um composto volátil associado ao patossistema hospedeiro (*Glycine max*) e o estudo da interação incompatível com *Phaseolus lunatus***. 2013. 91 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

## RESUMO

*Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da Ferrugem Asiática da Soja (FAS), é considerado um dos patógenos mais importantes do mundo, gerando prejuízos econômicos da ordem de bilhões de dólares. Áreas produtoras da cultura têm sofrido perdas expressivas na produção, decorrente do ataque da FAS. Atualmente, seis *loci* de resistência (*Rpp1-Rpp6*) foram identificados na soja. No entanto, nenhuma cultivar comercial possui uma efetiva e duradoura resistência a todos os isolados do patógeno. A identificação de hospedeiros alternativos e não hospedeiros à FAS tem contribuído com a identificação de genes e rotas metabólicas atuantes nos processos de defesa da planta. No presente estudo, importantes avanços foram obtidos no que diz respeito às respostas de defesa da planta durante a interação com *P. pachyrhizi*. Um composto orgânico volátil foi identificado como um biomarcador de soja inoculada com a FAS. A redução desse composto após a inoculação de *P. pachyrhizi* foi diretamente proporcional ao nível de infecção da planta. Além do mais, foi obtido o transcriptoma de plantas de *Phaseolus lunatus* (fonte alternativa de resistência) inoculadas e não-inoculadas com a FAS. Transcritos relacionados à rota dos fenilpropanóides foram induzidos já nas horas iniciais do processo de infecção. Um transcrito associado a um gene *R* com domínio NBS-LRR foi induzido em plantas inoculadas e sua presença foi correlacionada à indução de genes relacionados à patogenicidade tais como quitinases, beta-glucanases e defensinas concomitante à presença de hifas de *P. pachyrhizi* no mesofilo. Essas informações contribuíram para um melhor entendimento dos mecanismos de defesa atuantes contra *P. pachyrhizi* e a associação das rotas metabólicas e genes envolvidos durante a defesa celular podem auxiliar os programas de melhoramento visando à obtenção de uma resistência efetiva e duradoura contra *P. pachyrhizi*.

**Palavras-chave:** Resistência genética. Interação Planta-Patógeno. Soja. Feijão-lima. Transcriptoma. Biomarcador. Gene de resistência.

BRITO JÚNIOR, Salvador Lima. **Asian Soybean Rust: Identification of a volatile organic compound associated with host pathosystem (*Glycine max*) and the study of incompatible interaction with *Phaseolus lunatus***. 2013. 91 p. Thesis (Doctor's degree in Genetics and Molecular Biology) – Londrina State University, Londrina. 2013.

## ABSTRACT

*Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian Soybean Rust (FAS), is considered one of the most important pathogens in the world, generating economic losses of billions of dollars. Crop producing areas have suffered significant losses due to ASR attack. Currently, six resistance loci (*Rpp1-Rpp6*) were identified in soybean genotypes. However, no commercial soybean cultivar has an effective and durable resistance to all pathogen isolates. Identification of alternative hosts and non-hosts to ASR has contributed to the identification of genes and metabolic pathways active in the processes of plant defense. In the present study, important advances were made about the plant defense responses during interaction with *P. pachyrhizi*. A Volatile Organic Compound (VOC) was identified as a biomarker of soybean plants inoculated with ASR. The reduction of this compound after inoculation of *P. pachyrhizi* was directly proportional to the plant infection level. Moreover, a transcriptome was obtained from plants of *Phaseolus lunatus* (an alternative source of resistance) inoculated and non-inoculated with ASR. Transcripts related to the phenylpropanoids pathway were induced in the initial hours of the infection process. A transcript associated with a *R* gene with a NBS-LRR domain was induced in inoculated plants and their presence was correlated with the induction of genes related to pathogenicity such as chitinases, beta-glucanases and defensins, concomitant with hyphae of *P. pachyrhizi* in mesophyll. These information contributed to a better understanding of the active defense mechanisms against *P. pachyrhizi* as well as association of metabolic pathways and genes involved in cellular defense could help the breeding programs to obtain an effective and durable resistance against *P. pachyrhizi*.

**Key Words:** Genetic resistance. Plant-Pathogen Interaction. Soybean. Lima beans. Transcriptome. Biomarker. Resistance genes.

## SUMÁRIO

1	– Introdução .....	11
2	– Objetivo geral.....	13
2.1	– Objetivos específicos .....	13
3	– Referências .....	14
4	– Asian Soybean Rust: Epidemiology, Genetic Resistance and Molecular Studies under Host and Non-Host Pathosystems.....	15
4.1	– Abstract .....	15
4.2	– Introduction .....	15
4.3	– Biological process of infection of <i>Phakopsora pachyrhizi</i> and environmental conditions to bioassay approaches .....	17
4.4	– Genetic Resistance.....	21
4.5	– Molecular Studies on Host Resistance .....	24
4.6	– Molecular Studies on Non-host Resistance .....	28
4.7	– Conclusion .....	30
4.8	– Acknowledgements .....	31
4.9	– References.....	32
5	Identificação do composto volátil (e,e) $\alpha$ -farnesene associado ao patossistema soja- <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .....	36
5.1	– Resumo .....	36
5.2	– Introdução .....	37
5.3	– Material e Métodos .....	39
5.3.1	– Material Biológico e preparo do inóculo .....	39
5.3.2	– Coleta de compostos orgânicos voláteis.....	39
5.3.3	– Análises em Cromatografia Gasosa (GC) .....	40
5.3.4	– Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) .....	40
5.3.5	– Cálculo da área foliar infectada.....	41
5.3.6	– Efeito do COV sob folha de soja inoculadas com <i>P. pachyrhizi</i> .....	41
5.4	– Resultados e Discussão .....	42

5.5	– Referências Bibliográficas .....	48
5.6	– Anexo 1 .....	51
5.7	– Anexo 2 .....	52
6	– Análise do transcriptoma induzido de <i>phaseolus lunatus</i> durante interação com <i>Phakopsora pachyrhizi</i> e correlação com os eventos de penetração do fungo .....	53
6.1	– Resumo .....	53
6.2	– Introdução .....	54
6.3	– Material e Métodos .....	56
6.3.1	– Análise fenotípica da interação entre <i>Phakopsora pachyrhizi</i> e <i>Phaseolus lunatus</i> .....	56
6.3.2	– Microscopia Eletrônica de Varredura .....	56
6.3.3	– Inoculação de uredósporos de <i>P. pachyrhizi</i> em folhas destacadas e análises citológicas .....	57
6.3.4	– Obtenção de tecido foliar para análises de sequenciamento .....	57
6.3.5	– Obtenção do RNA e construção dos <i>Bulks</i> para sequenciamento .....	58
6.3.6	– Montagem do transcriptoma e cálculo do nível de expressão dos <i>contigs</i> .....	58
6.3.7	– Categorização funcional e identificação de <i>contigs</i> diferencialmente expressos .....	59
6.3.8	– Filtragem dos transcritos diferencialmente expressos .....	59
6.4	– Resultados .....	60
6.4.1	– Caracterização fenotípica das variedades de feijão-lima inoculadas com <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .....	60
6.4.2	– Análise do transcriptoma de folhas de <i>Phaseolus lunatus</i> infectadas com <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .....	63
6.4.3	– Transcritos diferencialmente expressos em <i>P. lunatus</i> .....	64
6.4.4	– Anotação dos genes diferenciais .....	65
6.4.5	– Transcritos anotados em processos biológicos .....	75
6.4.6	– Transcritos anotados em funções moleculares .....	79
6.5	– Discussão .....	83
6.6	– Perspectivas .....	88
6.7	– Referências Bibliográficas .....	89

## 1 - Introdução

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é uma espécie autógama, diplóide ( $2n=40$ ), alopoliplóide, que teria surgido no continente asiático (HYMOWITZ, 1970; GILL et al, 2009). Os primeiros registros de soja no Brasil são datados de 1882. O engenheiro agrônomo Gustavo D'Utra, introduziu, no Estado da Bahia, germoplasma proveniente dos Estados Unidos que por sua vez, não apresentaram uma adaptação às condições locais (BONETTI, 1981; MORAES et al., 1996). Somente na década de 1940 o Brasil iniciou as produções comerciais de soja, aumentando gradativamente a sua área plantada e produtividade.

A cultura da soja ocupa lugar de destaque no mercado de *commodities* do Brasil, e segundo dados da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), na safra 2012/2013, o país será o maior produtor mundial da cultura, com uma produção estimada de 82,86 milhões de toneladas (CONAB, 2013).

No entanto, a Ferrugem Asiática da Soja (FAS), causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*, tem provocado sérios danos econômicos aos países produtores de soja. O controle químico e o manejo da cultura têm sido os meios de minimizar os danos causados pela FAS. Algumas medidas têm sido adotadas, como o “vazio sanitário” (período de proibição de soja no campo durante a entressafra), semear cultivares mais precoces e evitar a semeadura em várias épocas e cultivares tardias. Além disso, semear a soja com densidade de plantas que favoreça bom arejamento foliar contribui para otimizar a penetração e a cobertura pelos fungicidas (YORINORI et al, 2004; ANDRADE & ANDRADE, 2006; SPOLTI et al, 2009).

A obtenção de cultivares com efetiva resistência ao patógeno tem sido um grande desafio para os programas de melhoramento genético dos países acometidos pela doença. Os genes de resistência conhecidos têm estabilidade restrita por causa da grande variabilidade de *P. pachyrhizi*, uma vez que várias fontes de resistência foram rapidamente quebradas pelos diferentes isolados do fungo. Sob esse aspecto, a obtenção de cultivares de soja com alta resistência e produtividade é uma medida de controle econômica e efetiva para garantir a sustentabilidade do agronegócio da soja, e os programas atuais de melhoramento tem se baseado em seis genes maiores de resistência (LI et al., 2012).

Além de estudos genéticos, trabalhos de expressão gênica e genômica funcional têm sido realizados com o intuito de identificar genes e rotas metabólicas importantes no processo de defesa da planta frente ao ataque da FAS. No entanto, a identificação de compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos pela soja durante a interação com *P. pachyrhizi*, não tem

sido reportada. As folhas normalmente liberam uma pequena quantidade de químicos voláteis, mas, quando a planta é danificada por danos físicos ou ataques de patógenos, muitos outros voláteis são liberados, que podem atuar como sinalizadores para ativação de mecanismos de defesa.

Outra vertente explorada na identificação de mecanismos de defesa da planta, diz respeito ao estudo de fontes alternativas de resistência, com a exploração de hospedeiros alternativos ao patógeno, bem como a resistência de plantas não hospedeiras. Várias espécies já foram identificadas como hospedeiro alternativo da FAS (SLAMINKO *et al.*, 2008), enquanto a grande maioria das plantas se comporta como não hospedeiras, como por exemplo, *Arabidopsis thaliana* e *Medicago truncatula*. Recentemente, avanços têm sido obtidos com a identificação de genes e rotas metabólicas importantes no processo de defesa da planta. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), hospedeiro principal de outro fungo causador de ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), foi identificado como um hospedeiro alternativo de *P. pachyrhizi*. Curiosamente, outra planta do gênero *Phaseolus*, o feijão-lima (*Phaseolus lunatus*), tem sido relatada como uma potencial fonte de resistência à FAS, uma vez que o fungo não consegue completar o seu ciclo de vida, sendo observadas raríssimas esporulações do patógeno (BONDE *et al.*, 2008). Assim, a elucidação de mecanismos de defesa em plantas de *P. lunatus* infectadas com a ferrugem da soja podem levar à identificação de novos genes para resistência à *P. pachyrhizi*.

## 2 - Objetivo geral

Avaliar a produção de metabólitos secundários voláteis em plantas de soja, infectadas com *Phakopsora pachyrhizi* e obter o perfil transcricional em plantas de *Phaseolus lunatus* infectadas e não infectadas pelo fungo; e assim contribuir para um maior conhecimento sobre os mecanismos de defesa atuantes contra a ferrugem asiática.

### 2.1 - Objetivos específicos

- Identificar a produção de metabólitos secundários voláteis em plantas de soja infectadas com *P. pachyrhizi*.
- Identificar VOCs como biomarcadores de resposta de defesa da planta à infecção com *P. pachyrhizi*.
- Caracterizar por microscopia e avaliação *in situ* o patossistema *P.lunatus* - *P.pachyrhizi*.
- Gerar bibliotecas com transcritos induzidos em *P. lunatus*, durante a interação com a FAS;
- Identificar genes diferencialmente expressos entre as plantas de *P. lunatus* infectadas e não infectadas com o patógeno;

### 3 - Referências

- ANDRADE, P.J.M.; ANDRADE, D.F.A.A. Controle Químico da Ferrugem Asiática da Soja. In **Ferrugem Asiática da Soja**. Editor: Laércio Zambolim. p.61-72, 2006.
- BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BERNER, D. K.; FREDERICK, R. D.; MOORE, W. F.; LITTLE, S. Comparative Susceptibilities of Legume Species to Infection by *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, v. 92, n. 1, p. 30-36, 2008.
- BONETTI, L. P. "Distribuição da soja no mundo. In: **A soja no Brasil**, Campinas: ITAL, p. 1-6, 1981.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira – Levantamento da Safra 2012/2013., 2013. Disponível em: < [www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_01\\_09\\_17\\_44\\_20\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_janeiro_2013.pdf) >.
- GILL, N.; FINDLEY, S.; WALLING, J. G.; HANS, C.; MA, J.; DOYLE, J.; STACEY, G.; JACKSON, S. A. Molecular and chromosomal evidence for allopolyploidy in soybean. **Plant physiology**, v. 151, n. 3, p. 1167-1174, 2009.
- HYMOWITZ, T. "On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v. 24, n. 4, p. 408-421, 1970.
- LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, n. 1, p. 133-42, Jun 2012.
- MORAES, A. A. C.; SILVA, A. L.; CARVALHO FILHO, A.; AMABILE, R. F. Histórico da Soja. In: **Soja: Suas Aplicações**, Rio de Janeiro: MEDSI. 259p. 1996.
- SLAMINKO, T. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; BONDE, M. R.; HARTMAN, G. L. New Legume Hosts of *Phakopsora pachyrhizi* Based on Greenhouse Evaluations. **Plant Disease**, v. 92, n. 5, p. 767-771, 2008.
- SPOLTI, P.; GODOY, C. V.; DEL PONTE, E. M. Sumário da dispersão em larga escala das epidemias de ferrugem asiática da soja no Brasil em quatro safras (2005/06 a 2008/09). Londrina: Embrapa Soja (**Documentos 315**), p. 11-19, 2009
- YORINORI, J.T.; NUNES JÚNIOR, J.; LAZZAROTTO, J.J. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. Londrina: Embrapa Soja. 36p. (**Documentos, 247**), 2004.
- YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. E.; GODOY, C. V.; NUNES, J. Epidemics of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 675-677, 2005.

#### **4 - Asian soybean rust: epidemiology, genetic resistance and molecular studies under host and non-host pathosystems**

S. L. Brito Junior<sup>1</sup>; R. V. Abdelnoor<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of General Biology, Londrina State University, P.O. Box 6001, 86051-990, Londrina-PR, Brazil.

<sup>2</sup>Embrapa Soybean, P.O. Box 231, 86001-970, Londrina-PR, Brazil.

Author for correspondence: ricardo.abdelnoor@embrapa.br

Short title: Asian Soybean Rust: Epidem, Genet Resist and Mol Studies

Key words: *Phakopsora pachyrhizi*, *Glycine max*, Host Resistance, Non-host Resistance, Molecular Plant-Pathogen Interaction

##### **4.1 - Abstract**

Asian Soybean Rust (ASR), a foliar disease caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, has caused serious economic losses to soybean crop. The development of resistant soybean lines to this fungus has been a challenge, and currently the main methods of control are based on crop management and fungicide applications. Presently, six major resistance *loci* against ASR have been described and mapped on the soybean genome. However, little is known about the defense mechanism imposed by the plant. Over the last few years, a number of genetic and molecular studies have been carried out with the aim of identifying genes and proteins that are involved on the response to the infection by this pathogen. This review details some aspects of the epidemiology process of *P. pachyrhizi* and describes the recent advances related to molecular and genetic mechanisms imposed by host and non-host plants against this aggressive pathogen.

## 4.2 - Introduction

*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. is the biotrophic fungus responsible for Asian Soybean Rust (ASR), a devastating foliar disease. Recently, *P. pachyrhizi* was referenced as one of the most scientifically/economically important fungal pathogens in the world (DEAN *et al.*, 2012). ASR was first discovered in Japan in 1902 (HENNING, 1903), and along the 20<sup>th</sup> century, it was found in China, Australia, India and Africa, when was reported in 1996 (AKINSANMI *et al.*, 2001). In 2001, the fungus was found affecting soybean cropping areas in Paraguay and Brazil and by the 2001/2002 crop season, the rust had already affected more than 60% of the cultivated area in Brazil with losses from 30 to 75% (YORINORI *et al.*, 2005). Posteriorly, in 2003, the fungus was described in Bolivia (ROSSI, 2003) and in 2004 it reached the continental USA (SCHNEIDER *et al.*, 2005).

According to atmospheric assays, *P. pachyrhizi* reached USA brought by Ivan hurricane (ISARD *et al.*, 2005). Indeed, ASR spores are easily transported by wind to long distances. Probably ASR was introduced in Brazilian territory by wind as well, from Africa. The Brazilian ASR population has been shown to share similarities to African ASR population and according to the genetic distribution of ASR in Brazil, possibly, the origins are due to multiple events of independent introductions (FREIRE *et al.*, 2008).

Since arriving at South and North American continent, the main soybean producer in the world, research efforts have been done by public and private institutions with the goal of a better understanding of this complex pathosystem that could lead to alternative methods of control and then guarantying increased production. Nowadays the efficient control of ASR depends on the careful and continuous crop monitoring and the opportune application of fungicides, considering that, to date, no soybean commercial cultivar is completely resistant to all races of ASR.

Considering the great advances that has been done about this pathosystem, in this review we summarize the recent progress on the study of the interaction between soybean and the Asian rust pathogen, considering the epidemiology, genetic resistance and a molecular approach of the interaction with host and non-host plants.

### 4.3 - Biological process of infection of *Phakopsora pachyrhizi* and environmental conditions to bioassay approaches

*Phakopsora pachyrhizi* has a globular spore approximately 18-38  $\mu\text{M}$  long by 13-29  $\mu\text{M}$  wide (VITTAL *et al.*, 2011) consisting of a thin surface layer that makes the fungus susceptible to environmental changes.

Temperature and humidity have been mentioned as the two environmental factors that have a direct influence over the ASR infection process. The germination of *P. pachyrhizi*, generally, occurs over four hours, at temperatures between 20 and 25 $^{\circ}\text{C}$ . Variations outside this range can compromise this process (MARCHETTI *et al.*, 1976; BONDE *et al.*, 2007), and temperatures higher than 33 $^{\circ}\text{C}$  can reduce the lesion production by 19%. The interesting is that a short period of high temperature during the day, even one hour, has more effect over the spore viability than average season temperatures (BONDE *et al.*, 2012) (Figure 1).

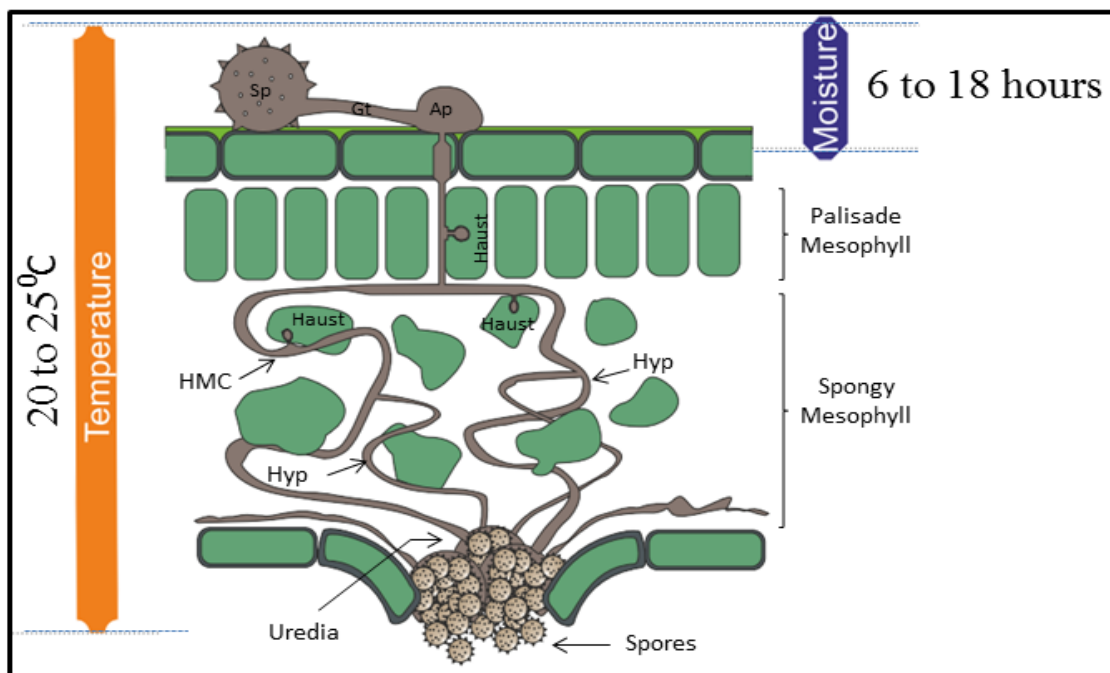


Figure 1 - Development stages of interaction between *Phakopsora pachyrhizi* and soybean. Under favorable conditions of temperature and moisture, the spore forms a germ tube with a globular structure in the final portion, denominated appressorium. By physical and chemical action, the penetration occurs directly through the epidermis, leading to infection hypha. Posteriorly, the parasitic relationship is established through the formation of haustorium. In the final step, several hyphae converge to form the uredia, which will produce new spores. After development of uredia, occurs the leaf tissue rupture promoting the release of new spores. Sp: Spore; Gt: Germ tube; Ap: Appressorium; HMC: Haustorium-Mother Cell; Haust: Haustorium; Hyp: Hyphae.

However, to have a successful penetration process, a humid environment is also important. As previously mentioned, *P. pachyrhizi* has a spore with a thin surface layer and the moist condition protects the spore against dehydration. A period of 6 to 12 hours under these conditions is essential for this process (MARCHETTI *et al.*, 1976) (Figure 1).

After germination, *P. pachyrhizi* develops a germ tube over the leaf surface with a globose structure at the end, denominated apressorium, responsible for fixing the fungus over the cuticle (Figure 2a). Preferentially, the apressorium is positioned over the anticlinal walls of adjacent cells (Figure 2a). But the penetration point is formed in the peripheral area of the epidermal wall (Figure 2b). This has been reported as the first visible interaction between ASR and the host plant (EDWARDS & BONDE, 2011).

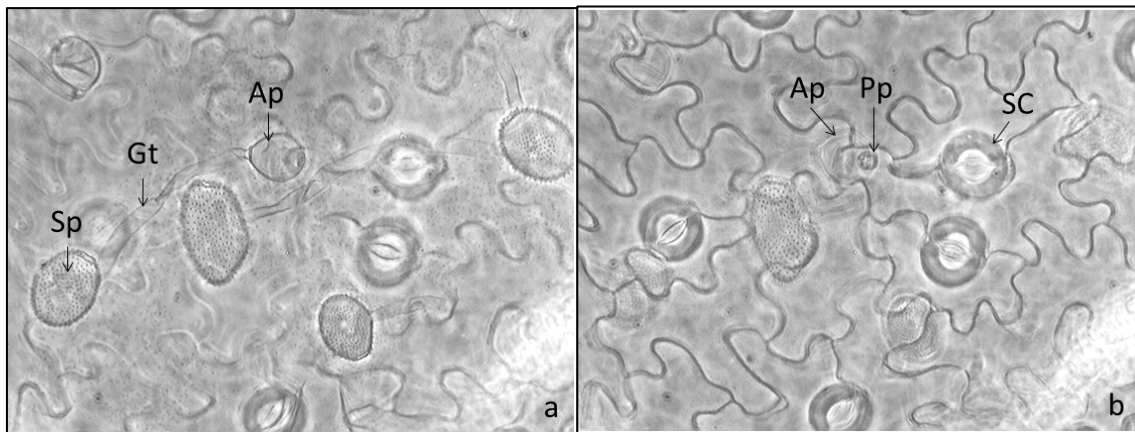


Figure 2 - Development of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean leaves, obtained by light microscopy. (a) The apressorium is preferentially positioned on the anticlinal wall of adjacent cells. (b) The penetration point takes place in the peripheral area of epidermal wall. Preferably, the penetration occurs through the epidermis and not by natural openings, as stomatal opening. Sp: Spore; Gt: Germ tube; Ap: Apressorium; Pp: Penetration point; SC: Stomatal Cell.

When the apressorium is positioned over the cuticle, a fibril matrix is formed at point of contact, referred as an extracellular matrix. It was proposed that adhesion could be the principal function of this fibril matrix, which indicates that an adhesion procedure failure could lead a resistance pathway against *P. pachyrhizi* (EDWARDS & BONDE, 2011).

The uredospore of ASR has a dikaryotic nucleus (N+N) that during the germination process goes through the germ tube to the apressorium where they undergo a mitotic division originating four nucleus, present in a developed apressorium (VITTAL *et al.*, 2011). Curiously, *P. pachyrhizi* has a characteristic to form networks between germ tubes, a process known as anastomosis. This association could be

responsible for a sexual recombination conducting to a nucleus exchange between different spores, contributing to a genetic diversity of *P. pachyrhizi* (VITTAL *et al.*, 2011).

After completing the first step of the infection process (spore germination, germ tube and apressorium formation), *P. pachyrhizi* promotes a direct penetration through the epidermis (EDWARDS & BONDE, 2011) (Figure 2b). This is not a common characteristic of rust fungi, which preferentially penetrate through the stomata.

Using mechanical force, it breaches the cuticle and by enzymatic activities, the cell wall is degraded allowing the fungus to gain access to the cell interior. Once inside the epidermal cell, *P. pachyrhizi* forms the primary hyphae that continue growing through the mesophyll producing the secondary hyphae, colonizing the tissue (EDWARDS & BONDE, 2011) (Figure 3).

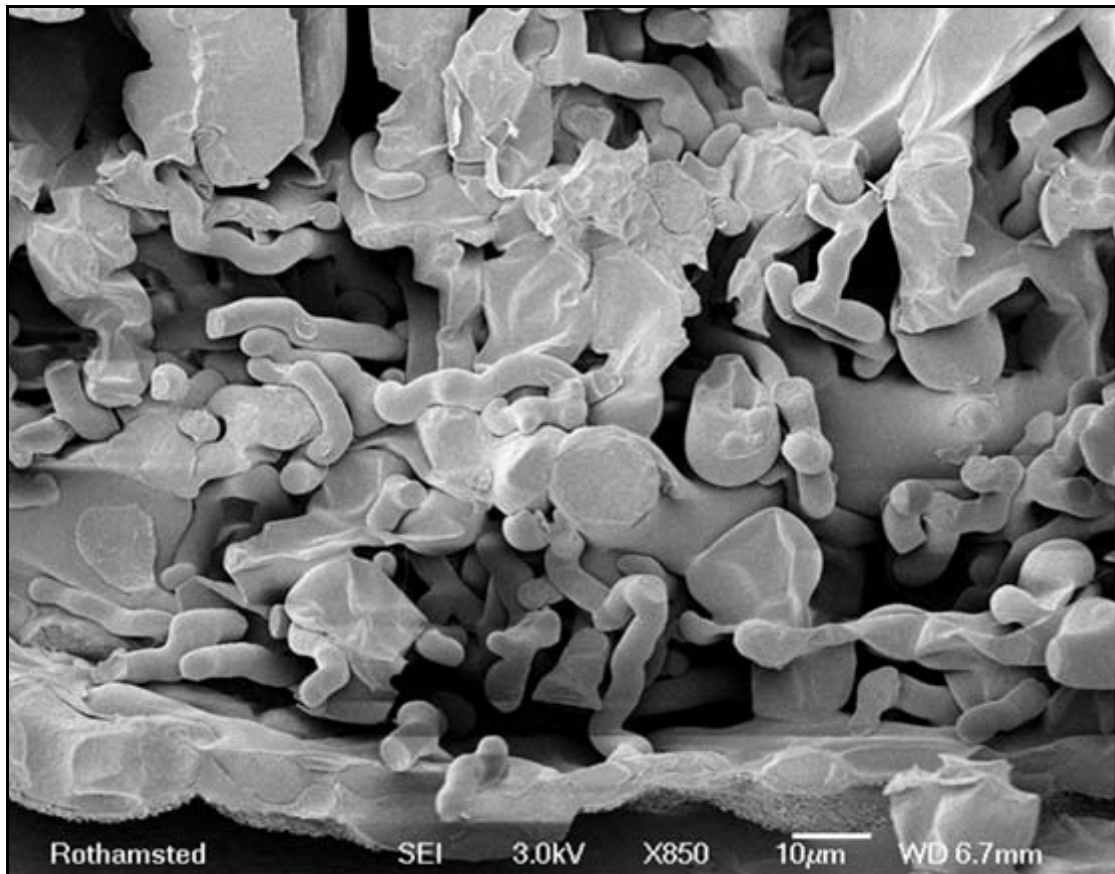


Figure 3 - Scanning Electron Micrograph of a foliar section of susceptible soybean genotype (Embrapa-48) showing the mesophyll completely colonized by hyphae of *Phakopsora pachyrhizi*.

Occasionally, the hyphae adhere strongly onto the wall of mesophyll cells, forming the Haustorium Mother Cell (HMC). At this point, by enzymatic action, a small hole is formed allowing the penetration of the haustorium into the cell, which is used by the fungus to absorb nutrients from the plant. The plasma membrane cell is contiguous

with the haustorium, forming a small space between them; denominated extrahaustorial matrix (EDWARDS & BONDE, 2011). This characterizes the specific biotrophic interaction between *P. pachyrhizi* and soybean and this structure can be seen in the mesophyll cell around 24 to 48 hours after spore germination.

After mesophyll colonization, the hyphae converge to form the uredia. The uredial growth culminates with foliar tissue rupture releasing new spores that are capable to produce new sites of infection (Figure 1). This spore production can be maintained over 30 days by each uredia (YEH *et al.*, 1982). In the area of uredia formation it is possible to see necrotic and chlorotic areas over the leaf surface, corresponding to disease symptoms.

Bearing in mind that *P. pachyrhizi* is a biotrophic fungus, the spores multiplication on agar plates is not possible. Thus, information about maintenance of this structure is essential, considering that it is used for bioassays.

TWIZEYIMANA & HARTMAN (2010), studying the culturing of *P. pachyrhizi* over detached leaves, showed that responses of the infection process were similar in greenhouse and in the field. The spores of *P. pachyrhizi* formed over susceptible genotypes of soybean plants were produced in greater quantity and quality than in resistant genotypes. In addition, the infection process was observed on both leaf surfaces, but preferentially the uredia were formed over the abaxial surface. The possibility to study the infection process caused by *P. pachyrhizi* over detached leaves could be an interesting alternative, considering space and good control to avoid cross contamination.

Complementing studies on maintenance of fungus pathogenicity and virulence, SCHMITZ & STAMMLER (2012) verified the effects of long-term storage methods of uredospores of *P. pachyrhizi*. The authors concluded for spore collection the method of 'tapping the leaves' is considered the most effective procedure. After collection, the spores have to be dehydrated overnight before storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Under these conditions, the effectiveness and infectivity can be maintained over one year. To reactivate the spores, they have to be suspended in water with the surfactant tween20 and this suspension is sufficient and effective for plant inoculation. The steps of hydration and thermal shock, generally used to break the spore dormancy can be omitted.

#### 4.4 - Genetic Resistance

The resistance in a pathosystemic approach, basically, can be classified in host and non-host resistance. A gene-for-gene resistance characterizes the first one (FLOR, 1971) where the resistance level is dependent on plant genotype and pathogen race. On the other hand, in non-host pathosystems, the plant develops a resistance against all races of a specific pathogen (SCHULZE-LEFERT & PANSTRUGA, 2011). This is considered a general and durable resistance mechanism where the pathogen cannot complete its life cycle.

Considering the Soybean - *P. pachyrhizi* host pathosystem, the genetic resistance is manifested by three phenotypes: susceptible, partial resistance, and immune plants. Due to the high genetic variation of the fungus, some plants can be resistant to some isolates and susceptible to others.

Plants without disease symptoms characterize the immune phenotype. A resistant plant, on the other hand, has necrotic areas over the leaf surface with few numbers of uredia by lesion and low level of sporulation. These lesions, referred to as RB (Reddish Brown), are formed as a consequence of a Hypersensitive Response (HR), a complex form of programmed cell death. Regarding resistant plants, the spores are produced in low quantity and reduced germination potential, when compared with susceptible plants (TWIZEYIMANA & HARTMAN, 2010). In fact, susceptible plants are discernible by an increased number of uredia by lesion with a high level of sporulation. In relation to susceptible soybean genotypes, ASR develops yellowish lesions, denominated TAN (BROMFIELD, 1984; PHAM *et al.*, 2009).

Nowadays, no soybean commercial cultivar is completely resistant to ASR and chemical control and crop management have been the way to minimize the disease damage. Moreover, the application of fungicide increases the cost of production besides being environmentally harmful.

The term “resistant”, considering this pathosystem, in fact is a partial resistance; bearing in mind *P. pachyrhizi* is able to complete its life cycle. MILES *et al.* (2011), studying the genetic resistance of soybean against *P. pachyrhizi*, redefined the concept of the partial resistance in this pathosystem. Using 34 soybean access and four ASR isolates, the authors verified the lesion type, severity and numbers of uredia by lesion, sporulation level of the uredia, and uredia diameter. The disease severity was not associated with the lesion type (RB or TAN). According these results, the most important trait to evaluate a

germplasm collection against *P. pachyrhizi* was the uredial counting, in view of the inverse relationship between uredia number and soybean production. Additionally, this trait gave good genotype discriminations and showed to be a good parameter measuring the partial resistance of soybean against ASR.

The genetic resistance of soybean against *P. pachyrhizi* is given by race specific genes, denominated *Rpp* (Resistance to P*hakopsora p*a*chy*rhizi). Currently, six *Rpp loci* have been reported in the literature: *Rpp1* (MCLEAN & BYTH, 1980), *Rpp2* (BROMFIELD & HARTWIG, 1980), *Rpp3* (HARTWIG & BROMFIELD, 1983), *Rpp4* (HARTWIG, 1986), *Rpp5* (GARCIA *et al.*, 2008) and *Rpp6* (LI *et al.*, 2012). The resistance conferred by these *loci* depends on the pathogen race and only *Rpp1* has shown immunity against some ASR isolates (HARTWIG, 1986; HARTMAN *et al.*, 2005).

Genetic mapping has been carried out to locate these *Rpp loci* on the soybean genome. The first mapped locus was *Rpp1* in PI200492, positioned between the SSR markers Sct\_187 and Sat\_064 on chromosome (chr) 18 (HYTEN *et al.*, 2007). About the same time, MONTEROS *et al.* (2007) studying the Japanese cultivar Hyuuga (PI506764), previously reported as RB phenotype against an isolate of *P. pachyrhizi*, identified a locus on chr 6, between markers Satt134 and Satt460. Unable to determine which *Rpp* was found, the authors temporarily attributed the name *Rpp?* (“*Hyuuga*”).

Two years later others three *Rpp loci* were located. SILVA *et al.* (2008) mapped *Rpp2* (PI 230970) on chr 16 (between SSR markers Sat\_255 and Satt620) and *Rpp4* (PI459025) on chr 18 (between SSR markers Satt288 and AF162283). A new locus, nominated *Rpp5*, was mapped on chr 03, between the SSR markers Sat\_275 and Sat\_280, in PI200526, PI200456 and PI471904 (GARCIA *et al.* 2008). However, only the gene carried by PI200526 showed a recessive fashion (*rpp5*). The authors could not determine if they were alleles of the same locus or strongly linked genes.

Using a combination of Single Nucleotide Polymorphic (SNP) and SSR markers, the *Rpp3* locus was mapped on chr 6, between Satt460 and Sat\_263 markers, on PI462312 (HYTEN *et al.*, 2009). This is the same region where *Rpp?*(*Hyuuga*) was previously mapped, indicating that they are the same locus with the same or different alleles or are two tightly linked *loci*.

Curiously, PI462312 (*Rpp3*), PI506764 (*Rpp?*“*Hyuuga*”) and two *Rpp5* lineages (PI200487 and PI471904) showed the same SNP haplotypes on chr 6, comparing with others 38 soybean access (MONTEROS *et al.*, 2010). According to this observation, KENDRICK *et al.* (2011) elegantly revealed that PI506764 (*Rpp?*“*Hyuuga*”) showed a

natural case of gene pyramiding. After comparing the resistance displayed by PI506764 (*Rpp?* “*Hyugga*”), PI462312 (*Rpp3*), PI200487 (*Rpp5*) and PI471904 (*Rpp5*), the authors concluded that resistance exhibited by PI506764 is conditioned by two *loci*; one located in the *Rpp3* region on chr 6 and a second resistance locus located on chr 3 between SSR03-866 and SSR03-940 markers. This is the same chromosomal region of *Rpp5* locus. In summary, *Rpp?* (“*Hyugga*”) could be carrying an allele of *Rpp3* and an allele of *Rpp5* resistance genes.

Screening of soybean genotypes has been done with the objective to identify new resistance sources against *P. pachyrhizi*. These efforts are crucial for the breeding programs, considering the high genetic variation of ASR and consequent selection pressure during the coevolution of resistance genes and pathogen effectors.

This continuing search process allowed the identification of a probable *Rpp1* allele. The genotype PI595538A was identified as a potential source of resistance against ASR after a screening of 16,595 soybean access against four isolates of *P. pachyrhizi*. This locus was also mapped on chr 18, and named *Rpp1-b*. It is considered an allele of *Rpp1* because it was mapped at only 1 cM distance from *Rpp1* locus and when PI595538A was tested against the isolate ZM01-1 it produced lesions RB (resistant) while the PI200492 (*Rpp1*) showed susceptible phenotype - TAN lesion (CHAKRABORTY *et al.*, 2009).

Recently, a new locus, denominated *Rpp6*, was mapped in PI567102B on chr 18 between SSR markers Satt324 and Satt394. This is the same chromosome where the *loci* *Rpp1*, *Rpp4* and the allele *Rpp1-b* were previously mapped. All SRR markers flanking known *Rpp loci* were tested, but they were not associated with the locus in the PI567102B. For these reasons it was proposed as a new *Rpp* gene (LI *et al.*, 2012).

Concomitantly to screening of new source of resistance on soybean genotypes, the identification of alternative hosts to *P. pachyrhizi* is important to understand the fungus development over different pathosystems than soybean, considered its principal host. In addition to soybean, several other species have been identified as alternative host to ASR (ONO *et al.*, 1992; BONDE *et al.*, 2008; SLAMINKO *et al.*, 2008).

One of the main major crops also considered as an ASR host is the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). Despite having a compatible interaction with *P. pachyrhizi*, this legume can also be infected by another rust fungus (*Uromyces appendiculatus*). To evaluate if Common Bean has useful host resistance pattern against *P. pachyrhizi*, the lesion size and number of spores produced by ASR on *P. vulgaris* was compared with the symptoms produced by the causal agent *U. appendiculatus*. It was shown that the

pathosystem Common Bean - *P. pachyrhizi* is much less aggressive, which increases the possibility to explore this pathosystem as an alternative source for resistance in soybean. However, when comparing different cultivars of Common Bean infected by *P. pachyrhizi*, it was shown that the presence of resistance genes against *U. appendiculatus* have no effect over the ASR infection. Particularly, considering the genus *Phaseolus*, the Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) was shown with a high level of resistance against *P. pachyrhizi* (MILES *et al.*, 2007). Recently, it was shown that *P. pachyrhizi* can infects *Azelia xylocarpa*, considered the first mention of ASR over this genus (SEEMADUA *et al.*, 2012).

The identification of non-host and alternative hosts to *P. pachyrhizi* is very important to classical and molecular investigation of the mechanisms of pathogen attack and the defense system exhibited by plants. However, the concept of host and non-host has to be carefully investigated. Without sporulation, an infected plant cannot contribute to pathogen dissemination. Therefore, to a given species be considered as host, the complete pathogen life cycle must be taken into account.

#### 4.5 - Molecular Studies on Host Resistance

In recent years, investigations have been conducted to try to understand the molecular interaction between soybean and *P. pachyrhizi*. With a focus on different steps of the infection process, transcripts and proteins have been associated with the fungus development on soybean plants as well as related to the defense mechanisms shown by the plant.

*P. pachyrhizi* has a thigmotropic behavior during the spore germination (KOCH DR & HOPPE DR, 1988) and a preferential formation of the apressorium over anticlinal wall of adjacent cells of soybean plants (HOCH & STAPLES, 1987). Recently, STONE *et al.* (2012) studied spore germination on distilled water and on a solid surface of polystyrene. *Phakopsora pachyrhizi* preferentially required a solid surface to form the apressorium, considering the protein profile obtained in these two situations. One hundred and nineteen different proteins were identified. Fifty-five were specific for the solid surface (polystyrene) condition and only four were specific over distilled water. This study also revealed that, unlike the differential accumulation of proteins, the gene expression profile was similar on both conditions, indicating that a

solid surface has a greater influence on the translation process than transcription, during the ASR germination.

The defense mechanisms exhibited by soybean plants against *P. pachyrhizi*, have been referred to as a biphasic defense response. This was demonstrated by VAN DE MORTEL *et al.* (2007) after studying a gene expression profile in a resistant (PI 230970 – *Rpp2*) and susceptible (Embrapa-48) genotype of soybean inoculated with a Brazilian spore population of *P. pachyrhizi*. Comparing the gene expression profile between inoculated and mock-inoculated plants it was identified that there is a first burst of gene expression at 12 hours after inoculation (hai). Around 24 hai the gene expression returns to the mock-inoculated profile and remains until a second burst occurs, around 72 hai in the incompatible interaction and one day later in the susceptible plants.

The initial response was similar in both genotypes suggesting basal resistance mechanism activation and a non-specific recognition of ASR. This non-specific recognition could be induced by MAMPS (Microbe-Associated Molecular Patterns), as chitin fragment and molecules from the fungus, or through signals produced by the fungus during the penetration on dead epidermis cells in both interactions. On the other hand, the presence of a second response, initially exhibited by incompatible interaction, is in accordance with the presence of *Rpp2* locus in the PI 230970. It promotes the recognition of avirulence (avr) proteins, released by the fungus during the haustorium interaction, activating an early defense response (VAN DE MORTEL *et al.*, 2007).

PANDEY *et al.* (2011), used the VIGS (Virus Induced Gene Silencing) approach to silence 140 genes identified by VAN DE MORTEL *et al.* (2007). It was verified that 11 genes are essential to mediate the resistance of *Rpp2*. According to the results, it was proposed that resistance mediated by *Rpp2* is dependent on the Salicylic Acid (SA) pathway, considering that the silencing of GmEDS1, GmPAD4 and GmNPR1 genes have resulted in chlorotic areas and TAN lesion with abundant uredia in PI 230970, showing loss of resistance. GmEDS1 and GmPAD4 encode a lipase/esterase-like protein and are present within the same pathway of defense that regulates the SA accumulation. Incidentally, GmNPR1 is a central component to signal transduction mediated by SA, which demonstrates the correlation between these three genes in the first step of resistance mediated by *Rpp2*. Under this central role, it was showed that the Transcription Factors (TF) WRKY, DBTF and MYB regulate the

expression of GmOMT, GmPR1, GmPAL1 and other genes related to the phenylpropanoid pathway (PANDEY *et al.*, 2011).

Interestingly, the biphasic defense response was observed not only in the resistance mediated by *Rpp2*, but it was also confirmed in the PI462312, that carry the *Rpp3* locus (SCHNEIDER *et al.*, 2011). The gene responses were correlated with the fungus penetration through the epidermis and during the specific biotrophic interaction, corresponding to haustorium formation. This second burst of gene expression was quicker and with greater changes in the incompatible interaction.

Around 12 hai, the most common genes were up-regulated in both interactions. At 24 hai, the expression returned to the mock inoculated levels. Nevertheless, a second burst of gene expression was more intensive in the incompatible interaction, around 72 hai, whereas it was not detected in the compatible interaction until 144 hai.

This gene expression profile is in accordance with the biphasic response observed by VAN DE MORTEL *et al.* (2007) and enforces the idea that initially soybean fights against ASR using basal mechanisms of resistance. During the second step of differential gene expression, Rpp proteins promote a quicker response in resistant genotype by recognition of avr proteins released by fungus (SCHNEIDER *et al.*, 2011).

For almost all genic functional categories found in the experiment, a biphasic response was observed. Interestingly a stronger suppression of genes related to the photosynthesis process occurred in the incompatible interaction (SCHNEIDER *et al.*, 2011). This has been reported in other incompatible interaction between soybean and *P. pachyrhizi* (WANG *et al.*, 2012). Based on the observed response mediated by *Rpp3*, the authors suggest that compatible and incompatible interactions were represented in a similar gene expression pattern, but with different intensities.

Among all of Rpp *loci*, a great advance has been achieved on *Rpp4* locus, where a candidate gene to mediate the resistance in the locus *Rpp4* was identified (MEYER *et al.*, 2009). After sequencing a BAC (Bacterial Artificial Chromosome) clone containing the *Rpp4* locus in the susceptible soybean plant, Williams 82, three genes were identified as candidates of being the *Rpp4* locus. These genes carry a CC-NBS-LRR (Coiled-Coil - Nucleotide Binding Site – Leucine-Rich Repeat) motif family. Using conserved primers for these genes, it was found five orthologous candidate genes to mediate the *Rpp4* resistance (*Rpp4C1* to *Rpp4C5*) in the PI459025B and VIGS analysis confirmed that these candidate genes mediate the resistance in the *Rpp4* locus.

After comparing the susceptible and resistant genotype, it was shown that *Rpp4C4* is highly expressed in PI459025B and absent in Williams 82 genotype. Therefore, it was considered the primary candidate to resistance mediated by *Rpp4*. Bearing in mind that all of *Rpp4* candidates showed high similarity, it is possible that a small difference in the sequence of amino acids has been responsible for the resistance (MEYER *et al.*, 2009).

Interestingly, the regions that contain the *Rpp4* locus is duplicated in the soybean genome, being present in chromosome 9 and 18. However, the duplicated region in the chromosome 9 has a gap of 162 kb, corresponding to the region of *Rpp4* candidate genes (MEYER *et al.*, 2009). Considering the allopolyploid event in the soybean genome, confirmed by GILL *et al.* (2009), the junction of two ancestral genomes was formed by one ancestral genome carrying the chromosome 18 (with a functional locus *Rpp4*) and another ancestral genome with the chromosome 9 (*Rpp4* locus with gap). Consequently, it could be an explanation for the number of host legumen for ASR, considering that ancestral species could have a complete absence of the candidate genes for *Rpp4* (MEYER *et al.*, 2009).

To elucidate the final steps of ASR infection, transcriptomic analysis were performed from the uredial stages obtained by LCM - Laser Capture Microdissection - (TREMBLAY *et al.*, 2009). At 10 days after inoculation (dai), the uredia has spores in different stages of development and the principal objective is promoting the spore dispersion and the survival of the new spores generated. It was identified that some important *P. pachyrhizi* genes were linked with this necessity. For example, the gene isocitrate dehydrogenase, involved in the ATP production, was highly expressed at 20 and 48 hai and returned with a high expression in 10 dai. It is consistent with the necessity of energy for haustorium formation (20-48hai) and spore formation and dispersion (10 dai). Moreover, the Dek domain, found in the chitin synthase protein was expressed at 4 and 10 dai. This is consistent with the process of spore production, considering that chitin is a component of fungus cell wall. In addition, to promote the spore release, the fungus has to digest the plant cell wall. It was showed the expression of gene catechol dioxygenase in 10 dai is important to promote the plant wall digestion and spore release. Genes encoding dioxygenases enzymes are also involved in this process, promoting the breakdown of aromatic compounds, as lignin, the principal component of the plant cell wall (TREMBLAY *et al.*, 2009).

Curiously, it was observed that palisade and spongy mesophyll cells close to the region of uredia formation had a brown colour (TREMBLAY *et al.*, 2010). By microarray analysis, using mRNA extracted directly from these cells, 2,982 genes of soybean exhibited a differential expression when compared with mock-inoculated plants. The most part (77%) were suppressed, including genes related to energy processes, metabolism, carbon fixation, protein synthesis and nitrogen fixation. Among genes with enhanced expression, it was included gene associated with disease and defense. In spite of a defense gene induction, this was not efficient to produce an effective defense response, but demonstrates even in later stage of infection, the continuing fight of the plant against the pathogen.

#### 4.6 - Molecular Studies on Non-host Resistance

Non-Host Resistance (NHR) is an effective and durable form of natural resistance. This is the most common form of resistance in the nature and has been considered a good model to study the defense pathways activated during the pathogen attack, considering the success of defense mechanisms exhibited by this kind of interaction (HEATH, 2000; MYSORE & RYU, 2004).

In recent years, advances have been achieved on plant defense mechanisms against *P. pachyrhizi* in non-host pathosystems. Important genes and pathways involved in the resistance mechanisms against this pathogen have been discovered and can contribute to plant breeding programs to find a durable and solid resistance against ASR.

For example, a Xylanase Inhibitor Protein (XIP), obtained from a non-host plant (*Coffea Arabica*) showed a negative effect on *P. pachyrhizi* spore germination. These XIPs can actuate on the plant resistance mechanism to prevent the plant cell degradation by hydrolytic enzymes from the fungus. Potentially, the expression of these proteins in transgenic soybean plants could enhance the resistance against *P. pachyrhizi*, with low environmental impact (VASCONCELOS *et al.*, 2011).

Interesting, *P. pachyrhizi* seems to have a chemical/physical signal necessities for apressorium formation, an important structure to promote the fixation on the penetration point. This was demonstrated by UPPALAPATI *et al.* (2012) using the non-host system *Medicago truncatula* - *P. pachyrhizi*. Twenty-thousand mutants of *M. truncatula* were evaluated during interaction with *P. pachyrhizi*. An inhibitor of rust germ tube differentiation 1 (*irg1*) mutant was capable to promote a reduction of 50% in the

germination rate and in more than 75% in the apressorium formation of *P. pachyrhizi*. It was observed that *irg1* mutant had a similar gene sequence to the Transcription Factor PALM1, involved in the control of *M. truncatula* trifoliolate development. After microscopic and chemical analysis, it was verified that *irg1* mutant had a defective formation of epicuticular wax crystals and a reduced primary alcohol accumulation in the abaxial surface of *M. truncatula*. This phenotypic alteration increased the hydrophilicity on leaf abaxial surface in the mutant *irg1-palm1*. By analyses of the germination and differentiation of *P. pachyrhizi* over soybean plant and comparing the process on wild *M. truncatula* plants and mutants *irg1-palm1*, it was observed that the wax or the hydrofobicity in general induces the spore germination, but for the apressorium formation, more specific signals and components of the wax could be required (UPPALAPATI *et al.*, 2012).

As a biotrophic fungus, *P. pachyrhizi* depends on the living cell to guarantee its survival. Nevertheless, the cell survival on the penetration point reduces the efficiency of *P. pachyrhizi* penetration in barley, a non-host pathosystem. The presence of a protein denominated BAX, a pro-apoptotic regulator, involved in the programmed cell death has been reported in mammalian. In plants, to date, no report of any BAX homologue has been found, but a protein that inhibits the effect of BAX, denominated IB-1 (Inhibitor BAX 1) was reported in plants (XU & REED, 1998; KAWAI-YAMADA *et al.*, 2001; KAWAI-YAMADA *et al.*, 2004). It was demonstrated that an over-expression of IB-1 in Barley decreased the *P. pachyrhizi* penetration efficiency, while the IB-1 overexpression promotes an increase of CWA (Cell Wall Apposition) in the not penetrated cells and a consequent increase of resistance against *P. pachyrhizi* (HOEFLE *et al.*, 2009).

The dependence of cell death in the success of ASR penetration roused the hypotheses that in some moment of its life cycle, *P. pachyrhizi* could have necrotrophic lifestyle and be able to survive in dead cells. It was proposed based in the activation of Acid Jasmonic (JA) pathway, a marker for necrotrophic fungus. On the other hand, with the ability of surviving in dead cells, the fungus could avoid the resistance mechanisms activated by SA pathway, more related with biotrophic profiles (LOEHRER *et al.*, 2008).

LOEHRER *et al.* (2008) studied mutants of *Arabidopsis thaliana* related to genes of the fungus penetration (PEN1, PEN2 and PEN3) and genes of SA pathway (SID2 and EDS1) and JA pathway (JAR1). PEN1 is a syntaxin that can be related with vesicle

trafficking to the plasma membrane (ASSAAD *et al.*, 2004); PEN2 is a glycosyl hydrolase and PEN3 represents a ABC transporter (LIPKA *et al.*, 2005). It has been proposed that PEN2 and PEN3 work cooperatively where PEN2 activates an inactive precursor of a unknown metabolite released by PEN3 action, preventing the fungus penetration (STEIN *et al.*, 2006).

The authors suggested that in the resistance against *P. pachyrhizi* in *A. thaliana*, JAR1 and SID1 may work synergistically with PEN3. Curiously, it was observed an accumulation of PDF1.2, a marker related to JA pathway, in mutants inoculated with *P. pachyrhizi*. This was not expected considering JA is a marker for necrotrophic fungus. On the other hand, the accumulation of PR1-b, a related marker to defense against biotrophic fungus, was observed only in the later stage of inoculation.

For this reason, it was proposed that *P. pachyrhizi* could have a necrotrophic behavior in part of his life cycle, and this lifestyle variation could explain one of the reasons for the number of host plants for this fungus (LOEHRER *et al.*, 2008).

#### **4.7 - Conclusion**

Obtaining soybean cultivars with good resistance level and high yield is a measure of economic and effective control to guarantee the sustainability of soybean agribusiness. The physical and chemical mechanisms of ASR infection, as well as the molecular plant defense mechanisms are not precisely known, but great advances have been made.

A multidisciplinary interpretation of the defense mechanisms shown by plants, in a host and non-host concept, is crucial for an efficient intervention to this disease. The defense strategies against *P. pachyrhizi* have been elucidated in different steps of the infection process as well as the strategies of infection by the fungus during these interactions. These approaches are fundamental for correct and efficient intervention considering the ability of *P. pachyrhizi* to avoid the plant perception. The continued search for resistance sources against Asian Soybean Rust is quite important, considering the dynamic interaction, evolutionarily exhibited in the plant-pathogen interaction.

Understanding precisely all the steps of the defense pathways, from stress perception to physiologic/agronomic defense response, not only in soybean, but also in

other related species, will be the key for plant breeders on developing innovative strategies for more persistent tolerance/resistant commercial varieties.

#### **4.8 – Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge Mrs. Jean Devonshire for technical support in Scanning Electron Micrograph (The Rothamsted Centre for BioImaging, Rothamsted Research, Harpenden, UK). The authors also acknowledge the financial support from Embrapa and CNPq (Grant 552735/2007-8), and PhD scholarship to SLBJ from CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel).

#### 4.9 – References

- AKINSANMI, O.; LADIPO, J.; OYEKAN, P. FIRST REPORT OF SOYBEAN RUST (*PHAKOPSORA PACHYRHIZI*) IN NIGERIA. **PLANT DISEASE**, V. 85, N. 1, P. 97-97, 2001.
- ASSAAD, F. F. ET AL. THE PEN1 SYNTAXIN DEFINES A NOVEL CELLULAR COMPARTMENT UPON FUNGAL ATTACK AND IS REQUIRED FOR THE TIMELY ASSEMBLY OF PAPILLAE. **MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL**, V. 15, N. 11, P. 5118-5129, 2004.
- BONDE, M. R.; BERNER, D. K.; NESTER, S. E.; FREDERICK, R. D. EFFECTS OF TEMPERATURE ON UREDINIOSPORE GERMINATION, GERM TUBE GROWTH, AND INITIATION OF INFECTION IN SOYBEAN BY *PHAKOPSORA* ISOLATES. **PHYTOPATHOLOGY**, V. 97, N. 8, P. 997-1003, 2007.
- BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BERNER, D. K. EFFECTS OF DAILY TEMPERATURE HIGHS ON DEVELOPMENT OF *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* ON SOYBEAN. **PHYTOPATHOLOGY**, V. 102, N. 8, P. 761-768, 2012.
- BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BERNER, D. K.; FREDERICK, R. D.; MOORE, W. F.; LITTLE, S. COMPARATIVE SUSCEPTIBILITIES OF LEGUME SPECIES TO INFECTION BY *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*. **PLANT DISEASE**, V. 92, N. 1, P. 30-36, 2008.
- BROMFIELD, K.; HARTWIG, E. RESISTANCE TO SOYBEAN RUST AND MODE OF INHERITANCE. **CROP SCIENCE**, V. 20, N. 2, P. 254-255, 1980.
- BROMFIELD, K. R. SOYBEAN RUST. **MONOGRAPH, AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY**, N. 11, 1984.
- CHAKRABORTY, N.; CURLEY, J.; FREDERICK, R. D.; HYTEN, D. L.; NELSON, R. L.; HARTMAN, G. L.; DIERS, B. W. MAPPING AND CONFIRMATION OF A NEW ALLELE AT FROM SOYBEAN PI 594538A CONFERRING RB LESION-TYPE RESISTANCE TO SOYBEAN RUST. **CROP SCIENCE**, V. 49, N. 3, P. 783-790, 2009.
- DEAN, R.; VAN KAN, J. A.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. THE TOP 10 FUNGAL PATHOGENS IN MOLECULAR PLANT PATHOLOGY. **MOLECULAR PLANT PATHOLOGY**, V. 13, N. 4, P. 414-430, 2012.
- EDWARDS, H. H.; BONDE, M. R. PENETRATION AND ESTABLISHMENT OF *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* IN SOYBEAN LEAVES AS OBSERVED BY TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY. **PHYTOPATHOLOGY**, V. 101, N. 7, P. 894-900, 2011.
- FLOR, H. H. CURRENT STATUS OF THE GENE-FOR-GENE CONCEPT. **ANNUAL REVIEW OF PHYTOPATHOLOGY**, V. 9, N. 1, P. 275-296, 1971.
- FREIRE, M.; OLIVEIRA, L. O.; ALMEIDA, Á. M. R.; SCHUSTER, I.; MOREIRA, M. A.; LIEBENBERG, M. M.; MIENIE, C. EVOLUTIONARY HISTORY OF *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* (THE ASIAN SOYBEAN RUST) IN BRAZIL BASED ON NUCLEOTIDE SEQUENCES OF THE INTERNAL TRANSCRIBED SPACER REGION OF THE NUCLEAR RIBOSOMAL DNA. **GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**, V. 31, N. 4, P. 920-931, 2008.
- GARCIA, A.; CALVO, E. S.; DE SOUZA KIIHL, R. A.; HARADA, A.; HIROMOTO, D. M.; VIEIRA, L. G. MOLECULAR MAPPING OF SOYBEAN RUST (*PHAKOPSORA PACHYRHIZI*) RESISTANCE GENES: DISCOVERY OF A NOVEL LOCUS AND ALLELES. **THEORETICAL AND APPLIED GENETICS**, V. 117, N. 4, P. 545-553, 2008.
- GILL, N.; FINDLEY, S.; WALLING, J. G.; HANS, C.; MA, J.; DOYLE, J.; STACEY, G.; JACKSON, S. A. MOLECULAR AND CHROMOSOMAL EVIDENCE FOR ALLOPOLYPLOIDY IN SOYBEAN. **PLANT PHYSIOLOGY**, V. 151, N. 3, P. 1167-1174, 2009.
- HARTMAN, G. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D. BREEDING FOR RESISTANCE TO SOYBEAN RUST. **PLANT DISEASE**, V. 89, N. 6, P. 664-666, 2005.
- HARTWIG, E.; BROMFIELD, K. RELATIONSHIPS AMONG THREE GENES CONFERRING SPECIFIC RESISTANCE TO RUST IN SOYBEANS. **CROP SCIENCE**, V. 23, N. 2, P. 237-239, 1983.
- HARTWIG, E. E. IDENTIFICATION OF A FOURTH MAJOR GENE CONFERRING RESISTANCE TO SOYBEAN RUST. **CROP SCIENCE**, V. 26, N. 6, P. 1135-1136, 1986.
- HEATH, M. C. NONHOST RESISTANCE AND NONSPECIFIC PLANT DEFENSES. **CURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY**, V. 3, N. 4, P. 315-319, 2000.
- HENNINGS, P. SOME NEW JAPANESE UREDINALES. IV. **HEDWIGIA (SUPPL.)**, P. 107-108, 1903.
- HOCH, H.; STAPLES, R. STRUCTURAL AND CHEMICAL CHANGES AMONG THE RUST FUNGI DURING APPRESSORIUM DEVELOPMENT. **ANNUAL REVIEW OF PHYTOPATHOLOGY**, V. 25, N. 1, P. 231-247, 1987.
- HOEFLE, C.; LOEHRER, M.; SCHAFFRATH, U.; FRANK, M.; SCHULTHEISS, H.; HUCKELHOVEN, R. TRANSGENIC SUPPRESSION OF CELL DEATH LIMITS PENETRATION SUCCESS OF THE

- SOYBEAN RUST FUNGUS *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* INTO EPIDERMAL CELLS OF BARLEY. **PHYTOPATHOLOGY**, V. 99, N. 3, P. 220-226, 2009.
- HYTEN, D. L.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; FREDERICK, R. D.; CONCIBIDO, V. C.; NARVEL, J. M.; CREGAN, P. B. MAP LOCATION OF THE RPP1 LOCUS THAT CONFERS RESISTANCE TO SOYBEAN RUST IN SOYBEAN. **CROP SCIENCE**, V. 47, N. 2, P. 837-840, 2007.
- HYTEN, D. L.; SMITH, J. R.; FREDERICK, R. D.; TUCKER, M. L.; SONG, Q.; CREGAN, P. B. BULKED SEGREGANT ANALYSIS USING THE GOLDENGATE ASSAY TO LOCATE THE LOCUS THAT CONFERS RESISTANCE TO SOYBEAN RUST IN SOYBEAN. **CROP SCIENCE**, V. 49, N. 1, P. 265-271, 2009.
- ISARD, S. A.; GAGE, S. H.; COMTOIS, P.; RUSSO, J. M. PRINCIPLES OF THE ATMOSPHERIC PATHWAY FOR INVASIVE SPECIES APPLIED TO SOYBEAN RUST. **BIOSCIENCE**, V. 55, N. 10, P. 851-861, 2005.
- KAWAI-YAMADA, M.; JIN, L.; YOSHINAGA, K.; HIRATA, A.; UCHIMIYA, H. MAMMALIAN BAX-INDUCED PLANT CELL DEATH CAN BE DOWN-REGULATED BY OVEREXPRESSION OF ARABIDOPSIS BAX INHIBITOR-1 (ATBI-1). **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES**, V. 98, N. 21, P. 12295-12300, 2001.
- KAWAI-YAMADA, M.; OHORI, Y.; UCHIMIYA, H. DISSECTION OF ARABIDOPSIS BAX INHIBITOR-1 SUPPRESSING BAX-, HYDROGEN PEROXIDE-, AND SALICYLIC ACID-INDUCED CELL DEATH. **THE PLANT CELL ONLINE**, V. 16, N. 1, P. 21-32, 2004.
- KENDRICK, M. D.; HARRIS, D. K.; HA, B. K.; HYTEN, D. L.; CREGAN, P. B.; FREDERICK, R. D.; BOERMA, H. R.; PEDLEY, K. F. IDENTIFICATION OF A SECOND ASIAN SOYBEAN RUST RESISTANCE GENE IN HYUUGA SOYBEAN. **PHYTOPATHOLOGY**, V. 101, N. 5, P. 535-543, 2011.
- KOCH DR, E.; HOPPE DR, H. DEVELOPMENT OF INFECTION STRUCTURES BY THE DIRECT - PENETRATING SOYBEAN RUST FUNGUS (*PHAKOPSORA PACHYRHIZI* SYD.) ON ARTIFICIAL MEMBRANES. **JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY**, V. 122, N. 3, P. 232-244, 1988.
- LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. IDENTIFICATION OF A NEW SOYBEAN RUST RESISTANCE GENE IN PI 567102B. **THEORETICAL AND APPLIED GENETICS**, V. 125, N. 1, P. 133-142, 2012.
- LIPKA, V.; DITTGEN, J.; BEDNAREK, P.; BHAT, R.; WIERMER, M.; STEIN, M.; LANDTAG, J.; BRANDT, W.; ROSAHL, S.; SCHEEL, D.; LLORENTE, F.; MOLINA, A.; PARKER, J.; SOMERVILLE, S.; SCHULZE-LEFERT, P. PRE- AND POSTINVASION DEFENSES BOTH CONTRIBUTE TO NONHOST RESISTANCE IN ARABIDOPSIS. **SCIENCE**, V. 310, N. 5751, P. 1180-1183, 2005.
- LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; GOELLNER, K.; CONRATH, U.; SCHAFFRATH, U. CHARACTERIZATION OF NONHOST RESISTANCE OF ARABIDOPSIS TO THE ASIAN SOYBEAN RUST. **MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS**, V. 21, N. 11, P. 1421-1430, 2008.
- MARCHETTI, M.; MELCHING, J.; BROMFIELD, K. THE EFFECTS OF TEMPERATURE AND DEW PERIOD ON GERMINATION AND INFECTION BY UREDOSPORES OF *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*. **PHYTOPATHOLOGY**, V. 66, N. 4, P. 461-463, 1976.
- MCLEAN, R.; BYTH, D. INHERITANCE OF RESISTANCE TO RUST (*PHAKOPSORA PACHYRHIZI*) IN SOYBEANS. **CROP AND PASTURE SCIENCE**, V. 31, N. 5, P. 951-956, 1980.
- MEYER, J. D.; SILVA, D. C.; YANG, C.; PEDLEY, K. F.; ZHANG, C.; VAN DE MORTEL, M.; HILL, J. H.; SHOEMAKER, R. C.; ABDELNOOR, R. V.; WHITHAM, S. A.; GRAHAM, M. A. IDENTIFICATION AND ANALYSES OF CANDIDATE GENES FOR RPP4-MEDIATED RESISTANCE TO ASIAN SOYBEAN RUST IN SOYBEAN. **PLANT PHYSIOLOGY**, V. 150, N. 1, P. 295-307, 2009.
- MILES, M. R.; BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BERNER, D. K.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. CHARACTERIZING RESISTANCE TO *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* IN SOYBEAN. **PLANT DISEASE**, V. 95, N. 5, P. 577-581, 2011.
- MILES, M. R.; PASTOR-CORRALES, M. A.; HARTMAN, G. L.; FREDERICK, R. D. DIFFERENTIAL RESPONSE OF COMMON BEAN CULTIVARS TO *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*. **PLANT DISEASE**, V. 91, N. 6, P. 698-704, 2007.
- MONTEROS, M. J.; HA, B. K.; PHILLIPS, D. V.; BOERMA, H. R. SNP ASSAY TO DETECT THE 'HYUUGA' RED-BROWN LESION RESISTANCE GENE FOR ASIAN SOYBEAN RUST. **THEORETICAL AND APPLIED GENETICS**, V. 121, N. 6, P. 1023-1032, 2010.
- MONTEROS, M. J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D. V.; WALKER, D. R.; BOERMA, H. R. MAPPING AND CONFIRMATION OF THE 'HYUUGA' RED-BROWN LESION RESISTANCE GENE FOR ASIAN SOYBEAN RUST. **CROP SCIENCE**, V. 47, N. 2, P. 829-836, 2007.

- MYSORE, K. S.; RYU, C. M. NONHOST RESISTANCE: HOW MUCH DO WE KNOW? **TRENDS PLANT SCI**, V. 9, N. 2, P. 97-104, 2004.
- ONO, Y.; BURITICÁ, P.; HENNEN, J. F. DELIMITATION OF *PHAKOPSORA*, *PHYSOPELLA* AND *CEROTELIUM* AND THEIR SPECIES ON LEGUMINOSAE. **MYCOLOGICAL RESEARCH**, V. 96, N. 10, P. 825-850, 1992.
- PANDEY, A. K.; YANG, C.; ZHANG, C.; GRAHAM, M. A.; HORSTMAN, H. D.; LEE, Y.; ZABOTINA, O. A.; HILL, J. H.; PEDLEY, K. F.; WHITHAM, S. A. FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE ASIAN SOYBEAN RUST RESISTANCE PATHWAY MEDIATED BY RPP2. **MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS**, V. 24, N. 2, P. 194-206, 2011.
- PHAM, T.; MILES, M.; FREDERICK, R.; HILL, C.; HARTMAN, G. DIFFERENTIAL RESPONSES OF RESISTANT SOYBEAN ENTRIES TO ISOLATES OF *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*. **PLANT DISEASE**, V. 93, N. 3, P. 224-228, 2009.
- ROSSI, R. FIRST REPORT OF *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*, THE CAUSAL ORGANISM OF SOYBEAN RUST IN THE PROVINCE OF MISIONES, ARGENTINA. **PLANT DISEASE**, V. 87, N. 1, P. 102-102, 2003.
- SCHMITZ, H. K.; STAMMLER, G. EFFECTS OF LONG-TERM STORAGE METHODS ON THE INFECTIVITY OF UREDIOSPORES OF *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*. **JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY**, V. 160, N. 9, P. 500-503, 2012.
- SCHNEIDER, K. T.; VAN DE MORTEL, M.; BANCROFT, T. J.; BRAUN, E.; NETTLETON, D.; NELSON, R. T.; FREDERICK, R. D.; BAUM, T. J.; GRAHAM, M. A.; WHITHAM, S. A. BIPHASIC GENE EXPRESSION CHANGES ELICITED BY *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* IN SOYBEAN CORRELATE WITH FUNGAL PENETRATION AND HAUSTORIA FORMATION. **PLANT PHYSIOL**, V. 157, N. 1, P. 355-371, 2011.
- SCHNEIDER, R. W.; HOLLIER, C. A.; WHITHAM, H. K.; PALM, M. E.; MCKEMY, J. M.; HERNÁNDEZ, J. R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. FIRST REPORT OF SOYBEAN RUST CAUSED BY *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* IN THE CONTINENTAL UNITED STATES. **PLANT DISEASE**, V. 89, N. 7, P. 774-774, 2005.
- SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. A MOLECULAR EVOLUTIONARY CONCEPT CONNECTING NONHOST RESISTANCE, PATHOGEN HOST RANGE, AND PATHOGEN SPECIATION. **TRENDS IN PLANT SCIENCE**, V. 16, N. 3, P. 117-125, 2011.
- SEEMADUA, S.; BHASABUTRA, T.; BEASLEY, D. R.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G. A NEW HOST GENUS AND SPECIES (*AFZELIA XYLOCARPA*) FOR *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* FOUND IN THAILAND. **AUSTRALASIAN PLANT DISEASE NOTES**, P. 1-2, 2012.
- SILVA, D. C.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A.; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. O.; PEREIRA, S. S.; NOGUEIRA, L. M.; PASSIANOTTO, A. L.; ABDELNOOR, R. V. MOLECULAR MAPPING OF TWO LOCI THAT CONFER RESISTANCE TO ASIAN RUST IN SOYBEAN. **THEORETICAL AND APPLIED GENETICS**, V. 117, N. 1, P. 57-63, 2008.
- SLAMINKO, T. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; BONDE, M. R.; HARTMAN, G. L. NEW LEGUME HOSTS OF *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* BASED ON GREENHOUSE EVALUATIONS. **PLANT DISEASE**, V. 92, N. 5, P. 767-771, 2008.
- STEIN, M.; DITTGEN, J.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, C.; HOU, B. H.; MOLINA, A.; SCHULZE-LEFERT, P.; LIPKA, V.; SOMERVILLE, S. ARABIDOPSIS PEN3/PDR8, AN ATP BINDING CASSETTE TRANSPORTER, CONTRIBUTES TO NONHOST RESISTANCE TO INAPPROPRIATE PATHOGENS THAT ENTER BY DIRECT PENETRATION. **PLANT CELL**, V. 18, N. 3, P. 731-746, 2006.
- STONE, C. L.; MCMAHON, M. B.; FORTIS, L. L.; NUNEZ, A.; SMYTHERS, G. W.; LUSTER, D. G.; FREDERICK, R. D. GENE EXPRESSION AND PROTEOMIC ANALYSIS OF THE FORMATION OF *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* APPRESSORIA. **BMC GENOMICS**, V. 13, P. 269, 2012.
- TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N. W.; LI, S.; MATTHEWS, B. F. TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF A COMPATIBLE RESPONSE BY *GLYCINE MAX* TO *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* INFECTION. **PLANT SCIENCE**, V. 179, N. 3, P. 183-193, 2010.
- TREMBLAY, A.; LI, S.; SCHEFFLER, B. E.; MATTHEWS, B. F. LASER CAPTURE MICRODISSECTION AND EXPRESSED SEQUENCE TAG ANALYSIS OF UREDINIA FORMED BY *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*, THE CAUSAL AGENT OF ASIAN SOYBEAN RUST. **PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY**, V. 73, N. 6, P. 163-174, 2009.
- TWIZEYIMANA, M.; HARTMAN, G. L. CULTURING *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* ON DETACHED LEAVES AND UREDINIOSPORE SURVIVAL AT DIFFERENT TEMPERATURES AND RELATIVE HUMIDITIES. **PLANT DISEASE**, V. 94, N. 12, P. 1453-1460, 2010.
- UPPALAPATI, S. R.; ISHIGA, Y.; DORAISWAMY, V.; BEDAIR, M.; MITTAL, S.; CHEN, J.; NAKASHIMA, J.; TANG, Y.; TADEGE, M.; RATET, P.; CHEN, R.; SCHULTHEISS, H.; MYSORE,

- K. S. LOSS OF ABAXIAL LEAF EPICUTICULAR WAX IN *MEDICAGO TRUNCATULA* IRG1/PALM1 MUTANTS RESULTS IN REDUCED SPORE DIFFERENTIATION OF ANTHRACNOSE AND NONHOST RUST PATHOGENS. **PLANT CELL**, V. 24, N. 1, P. 353-370, 2012.
- VAN DE MORTEL, M.; RECKNOR, J. C.; GRAHAM, M. A.; NETTLETON, D.; DITTMAN, J. D.; NELSON, R. T.; GODOY, C. V.; ABDELNOOR, R. V.; ALMEIDA, Á. M. R.; BAUM, T. J. DISTINCT BIPHASIC MRNA CHANGES IN RESPONSE TO ASIAN SOYBEAN RUST INFECTION. **MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS**, V. 20, N. 8, P. 887-899, 2007.
- VASCONCELOS, E. A.; SANTANA, C. G.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D.; SILVA, M. S.; MOREIRA, L. R.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; PRICE, D.; FITCHES, E.; FILHO, E. X.; MEHTA, A.; GATEHOUSE, J. A.; GROSSI-DE-SA, M. F. A NEW CHITINASE-LIKE XYLANASE INHIBITOR PROTEIN (XIP) FROM COFFEE (*COFFEA ARABICA*) AFFECTS SOYBEAN ASIAN RUST (*PHAKOPSORA PACHYRHIZI*) SPORE GERMINATION. **BMC BIOTECHNOLOGY**, V. 11, P. 14, 2011.
- VITTAL, R.; YANG, H. C.; HARTMAN, G. L. ANASTOMOSIS OF GERM TUBES AND MIGRATION OF NUCLEI IN GERM TUBE NETWORKS OF THE SOYBEAN RUST PATHOGEN, *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*. **EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY**, V. 132, N. 2, P. 163-167, 2011.
- WANG, Y.; YUAN, X.; HU, H.; LIU, Y.; SUN, W.; SHAN, Z.; ZHOU, X. PROTEOMIC ANALYSIS OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED PROTEINS IN RESISTANT SOYBEAN LEAVES AFTER *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* INFECTION. **JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY**, P. 1-7, 2012.
- XU, Q.; REED, J. C. BAX INHIBITOR-1, A MAMMALIAN APOPTOSIS SUPPRESSOR IDENTIFIED BY FUNCTIONAL SCREENING IN YEAST. **MOLECULAR CELL**, V. 1, N. 3, P. 337-346, 1998.
- YEH, C.; SINCLAIR, J.; TSCHANZ, A. *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*: UREDIAL DEVELOPMENT, UREDIOSPORE PRODUCTION AND FACTORS AFFECTING TELIOSPORE FORMATION ON SOYBEANS. **CROP AND PASTURE SCIENCE**, V. 33, N. 1, P. 25-31, 1982.
- YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. E.; GODOY, C. V.; NUNES, J. EPIDEMICS OF SOYBEAN RUST (*PHAKOPSORA PACHYRHIZI*) IN BRAZIL AND PARAGUAY FROM 2001 TO 2003. **PLANT DISEASE**, V. 89, N. 6, P. 675-677, 2005.

## 5- IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO VOLÁTIL (E,E) A-FARNESENE ASSOCIADO AO PATOSSISTEMA SOJA-*PHAKOPSORA PACHYRHIZI*

Salvador L. Brito Júnior<sup>1</sup>, Ricardo V. Abdelnoor<sup>2</sup>, Clara B. Hoffmann-Campo<sup>2</sup>, Keith Chamberlain<sup>3</sup>, Jonathan D. G. Jones<sup>4</sup>, John A. Pickett<sup>3</sup>, Michael A. Birkett<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

<sup>2</sup> Embrapa Soja, Londrina-PR, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Biologia Química e Proteção de Culturas, Rothamsted Research, Harpenden, Reino Unido.

<sup>4</sup> Laboratório Sainsbury, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, Reino Unido.

### 5.1 - Resumo

Ferrugem Asiática da Soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, é uma devastadora doença foliar espalhada pela maioria das regiões de cultivo da soja. Trata-se de um fungo biotrófico que diferencia uma série de estruturas especializadas para estabelecer a infecção. As plantas são conhecidas por emitir compostos orgânicos voláteis (COVs) em resposta a vários estresses bióticos e abióticos. A identificação desses compostos e de seu papel nas interações planta-patógeno pode auxiliar os melhoristas a inserir mais rapidamente, entre outras características desejáveis, a resistência genética a patógenos, em novas cultivares. Não há relatos sobre a emissão de COVs relacionados ao patossistema Soja - *Phakopsora pachyrhizi*. Em virtude da complexa interação existente nos diferentes patossistemas, a análise desses metabólitos secundários contribui para a interpretação dos mecanismos de defesa impostos pela planta e conseqüentemente, abre possibilidades para uma intervenção eficiente no controle da doença. No presente estudo, o volátil (E,E)  $\alpha$ -farnesene foi identificado em plantas de soja inoculadas com o fungo da Ferrugem Asiática. O composto teve a sua produção diminuída após a inoculação e a redução foi diretamente associada ao nível de sintomas da planta.

**Palavras-chave:** Compostos Orgânicos Voláteis, Metabólito secundário, Biomarcador, Sesquiterpeno, Rota do Mevalonato

## 5.2 - Introdução

A Ferrugem Asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd., é uma das mais agressivas e severas patologias da soja, demandando esforços mundiais para o seu controle.

*Phakopsora pachyrhizi* promove sua penetração diretamente através da epiderme, ao contrário da maioria das ferrugens, que penetra o hospedeiro pelas aberturas na superfície foliar (MELLERSH & HEATH, 2003; EDWARDS & BONDE, 2011). Por se tratar de um fungo biotrófico, *P. pachyrhizi* obtém nutrientes a partir de células vivas do hospedeiro. Porém, curiosamente o fungo provoca a morte da célula epidérmica no ponto de penetração (HOEFLE *et al.*, 2009; SCHNEIDER *et al.*, 2011), o que levanta a hipótese de que em parte do seu ciclo de vida, poderia apresentar um comportamento necrotrófico. Isso demonstra o quão complexo é o patossistema Soja-*P. pachyrhizi* (LOEHRER *et al.*, 2008).

Uma vez colonizado o mesófilo foliar, o fungo promove a formação das urédias, estruturas que abrigam novos esporos. Após o rompimento da parede celular e ruptura das urédias, os esporos são liberados para o ambiente, sendo facilmente disseminados pelo vento. Em estágios avançados da doença a planta sofre queda foliar, o que compromete o processo fotossintético, e afeta diretamente o enchimento dos grãos, promovendo um forte decréscimo na produção (MCLEAN, 1979).

Uma vez que não existe cultivares comerciais de soja com uma efetiva resistência ao patógeno, o controle da Ferrugem Asiática da Soja (FAS) é realizado por meio da aplicação de fungicidas e manejo da cultura. Medidas como a adoção do “vazio sanitário” (período de proibição de soja no campo durante a entressafra) e a semeadura de cultivares mais precoces, além da semeadura da soja com densidade de plantas que favoreça bom arejamento foliar contribui para otimizar a penetração e a cobertura pelos fungicidas (YORINORI *et al.*, 2004; ANDRADE & ANDRADE, 2006; SPOLTI *et al.*, 2009).

É de conhecimento que a maioria das plantas, selvagens ou cultivadas, possui alguma resistência a patógenos que, em geral, envolve metabólitos secundários (PARÉ & TURLINSON, 1999; HEATH, 2000; KEMEN & JONES, 2012). As folhas normalmente liberam uma pequena quantidade de químicos voláteis, mas, quando a planta é submetida a danos físicos ou ataques de patógenos, esse padrão pode ser alterado (LAW & REGNIER, 1971). A identidade química do composto varia de acordo com a espécie vegetal e patógeno, correspondendo à dinâmica relação entre os diferentes patossistemas (CLAY & KOVER, 1996).

Estudos têm demonstrado que esses compostos orgânicos voláteis (VOCs – *Volatile Organic Compound*) liberados decorrentes do ataque de patógenos, pode ser reconhecido por plantas vizinhas ou partes sistêmicas intactas da planta que sofreu o ataque (BALDWIN *et al.*, 2006; HEIL & SILVA BUENO, 2007). Dessa forma, atuam como indutores de resistência (ARIMURA *et al.*, 2000) conduzindo a uma capacidade aumentada de mobilizar respostas de defesa infecto-induzidas (*priming*) na interação planta-patógeno (HEIL & SILVA BUENO, 2007).

Os COVs, liberados durante ataque de patógenos, tem sido explorados em diferentes patossistemas envolvendo bactérias (PICAUD *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2012) e fungos (CARDOZA *et al.*, 2002; MENDGEN *et al.*, 2006) e explorados também em interações envolvendo insetos (RÖSE & TUMLINSON, 2005; BLANDE *et al.*, 2007; PICKETT *et al.*, 2012; TAMIRU *et al.*, 2012),

Sobre a interação Soja-*Phakopsora pachyrhizi* muitos estudos de expressão gênica (VAN DE MORTEL *et al.*, 2007; TREMBLAY *et al.*, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2011) e genômica funcional (MEYER *et al.*, 2009; PANDEY *et al.*, 2011) têm sido realizados, mas, até o momento, não há relatos na literatura sobre COVs liberados pela soja durante a interação com a Ferrugem Asiática.

Dessa forma, considerando um campo inexplorado no patossistema Soja-Ferrugem Asiática, o objetivo desse estudo foi verificar o padrão de COVs emitido pela soja durante os estágios iniciais do processo infeccioso de *P. pachyrhizi* e assim, tentar identificar compostos voláteis que possam ser usados como biomarcadores associados a esse patossistema, e também que venham a ajudar no esclarecimento dos mecanismos de resposta da planta de soja a esse importante patógeno.

### 5.3 - Material e Métodos

#### 5.3.1 - Material Biológico e preparo do inóculo

Semanalmente, sementes de soja do cultivar Embrapa 48 (suscetível a ferrugem) e o acesso PI 230970 (resistente a ferrugem) foram plantadas em casa de vegetação ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; 50 a 60% de umidade e 12h/12h de fotoperíodo), em vasos individuais contendo uma planta cada, na unidade experimental do Rothamsted Research, Harpenden – Reino Unido. Após 21 dias, quatro plantas de um mesmo genótipo foram transferidas para uma sala climatizada (mantida sob as mesmas condições da casa de vegetação) e realizada a coleta de voláteis. Inicialmente foram realizadas as coletas em plantas falso-inoculadas e posteriormente em plantas inoculadas. Para tanto, uma população de uredósporos de *P. pachyrhizi* foram obtidos a partir de plantas de soja suscetíveis ao fungo (Embrapa 48) previamente inoculadas, mantidas em estufa climatizada separada. Os esporos coletados foram utilizados no preparo da suspensão feita com água destilada contendo 0,04% de Tween20 (v/v) e diluídos a concentração final de  $7 \times 10^4$  esporos/ml. Uma solução de água destilada contendo 0,04% de Tween20 (v/v) foi utilizada para a inoculação das plantas falso-inoculadas. Após a inoculação, as plantas foram acondicionadas em uma caixa de acrílico (90x40x40 cm) (anexo1) onde permaneceram por 18 horas, para fornecer condições ideais ao processo de infecção. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento (inoculado e falso-inoculado). A coleta dos compostos voláteis foi iniciada 18 horas após a inoculação (hai) e transcorrida ao longo de 48 horas. Avaliações fenotípicas macroscópicas foram realizadas diariamente até nove dias após a inoculação (dai) e posteriormente 15 e 21 dai, a fim de avaliar a presença e/ou ausência de lesões, bem como os tipos de lesões encontradas, sendo RB a lesão característica de resistência e TAN, característica de suscetibilidade.

#### 5.3.2 - Coleta de compostos orgânicos voláteis

Arraste gasoso (também conhecido como obtenção dinâmica de *headspace*) foi realizado seguindo procedimento padrão (WEBSTER *et al.*, 2008), utilizando materiais biológicos de três semanas de idade. Para cada coleta dos compostos voláteis, uma planta foi transferida para dentro de um recipiente de vidro (60 cm de altura x 15 cm de diâmetro interno) (anexo 2), aberto na parte inferior e com duas aberturas de coleta, uma na parte lateral (para a entrada do ar) e outra na parte superior (para saída). O fundo foi fechado sem pressão ao redor do caule da planta, utilizando duas placas de alumínio semicircular com um furo no centro para acomodar a haste. O ar, purificado pela passagem por meio de um filtro de carvão ativado, foi bombeado para dentro do recipiente, através da porta de entrada a 1.800 mL/minuto (a vazão

foi controlada por uma válvula de agulha e medida por um medidor de fluxo). O ar foi retirado a 800 mL/minuto e coletado em 50 mg de polímero Porapak Q em um tubo de vidro de 3 mm de diâmetro interno (Alltech Associates, Carnforth, Lancashire, Reino Unido). As diferenças nas taxas de fluxo criaram uma leve pressão positiva para garantir que o ar não filtrado não entrasse no sistema, eliminando assim a necessidade de uma vedação hermética em torno da haste. Todas as ligações foram feitas com tubulações de politetrafluoretileno - PTFE - (Alltech Associates), com ponteiros de metal e acessórios (North London Valve, Londres, Reino Unido). Os compostos orgânicos voláteis (COVs) coletados foram eluídos com 750  $\mu\text{L}$  de éter etílico bidestilado. As amostras para análises químicas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

### **5.3.3 - Análises em Cromatografia Gasosa (GC)**

Os COVs foram analisados em um Cromatógrafo Gasoso - GC (Agilent 6890) equipado com injetor com temperatura controlada, detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar apolar modelo HP-1 com sílica fundida com a fase ligada. A temperatura do forno foi mantida a  $30^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, e programada a  $5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  até  $150^{\circ}\text{C}$ , e mantida por 0,1 minutos, e então  $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  até  $250^{\circ}\text{C}$ . O gás de arraste foi o hidrogênio. Quatro microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de cada amostra eluída foram injetadas no GC. Os dados foram analisados usando o *software* HP ChemStation. A quantificação dos COVs foi realizada por um método de quantificação por padronização externa, utilizando amostras padrões (SKELTON *et al.*, 2010).

### **5.3.4 - Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (GC/MS)**

Análises de Espectrometria de Massa acoplada a um GC (MS-GC), dos extratos de COVs, foram realizadas utilizando uma coluna capilar de sílica fundida (50 m x 0,32 mm de espessura, filme com  $0,52\ \mu\text{m}$  de espessura, DB-1), ligado a um injetor com temperatura controlada, que está diretamente ligado a espectrômetro de massa por campo magnético (Autospec Ultima, Fisions Instrument, Manchester, Reino Unido). A ionização foi por impacto de elétrons (70 e V, temperatura de  $250^{\circ}\text{C}$ ). O gás Hélio foi o gás de arraste. A temperatura do forno foi mantida a  $30^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, e então programada para  $5^{\circ}\text{C}$  por minuto até  $250^{\circ}\text{C}$ . Identificações foram feitas pela comparação dos espectros com banco de dados de massa espectral (NIST, 2005).

### 5.3.5 - Cálculo da área foliar infectada

Para cálculo da Área Foliar Infectada (AFI) foi padronizado, por planta, o folíolo com maior nível visual de sintomas da doença. A imagem digital do folíolo foi processada usando o *software* Adobe Photoshop CS5. Os pontos das lesões foram substituídos por áreas brancas enquanto que a área foliar complementar foi preenchido em tons de verde. Posteriormente, a imagem foi analisada pelo software ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*), onde foi realizado o cálculo da área foliar sem as lesões e posteriormente com as lesões. Os valores obtidos permitiram quantificar a porcentagem de área foliar correspondente aos sintomas da doença.

### 5.3.6 - Efeito do COV sob folha de soja inoculadas com *P. pachyrhizi*

Para verificar se os COVs encontrados possuíam algum efeito sobre a infecção causada por *P. pachyrhizi*, folhas de soja (PI 230970 e Embrapa 48) foram destacadas e inoculadas com a FAS. Discos de papel filtro (2 cm<sup>2</sup>) umedecidos com 10 µL de uma solução de (E,E) alfa-farnesene (100 ng/µL) diluído em hexane foram adicionados diariamente dentro da placa de petri contendo as folhas inoculadas. Considerando que o hexane é um solvente prejudicial ao tecido foliar, após cada aplicação foi aguardado um curto período (aproximadamente 10 segundos) para a completa evaporação do solvente e imediatamente o segmento de papel filtro foi posicionado dentro da placa de petri contendo as folhas inoculadas. As placas foram seladas com parafilme. A aplicação da solução contendo o (E,E) α-farnesene foi repetida a cada 24 horas, durante quatro dias.

As folhas de soja utilizadas como controle, receberam discos de papel filtro contendo apenas o hexane, o qual foi evaporado antes da deposição do papel filtro dentro das placas de petri.

## 5.4 – Resultados e Discussão

As lesões em plantas de soja, resistentes e suscetíveis a *P. pachyrhizi*, são classificadas respectivamente como RB (marrom-avermelhada) e TAN (amarelada). O genótipo PI 230970 possui o alelo *Rpp2*, que confere fenótipo resistente quando inoculado com populações brasileiras de *P. pachyrhizi*. O genótipo Embrapa 48, por sua vez, não possui resistência e apresenta lesões do tipo TAN (VAN DE MORTEL *et al.*, 2007).

Esse padrão fenotípico foi confirmado em nosso experimento. Após a inoculação, as plantas foram avaliadas diariamente quanto à presença ou ausência de sintomas da ferrugem. Os sintomas da doença surgiram por volta do sétimo dia após a inoculação (dai). As lesões apresentadas pelo genótipo Embrapa 48 foram classificadas como TAN, enquanto que as lesões desenvolvidas pelo genótipo PI 230970 foram classificadas como RB (Figura 1), demonstrando a eficiência no processo da inoculação.

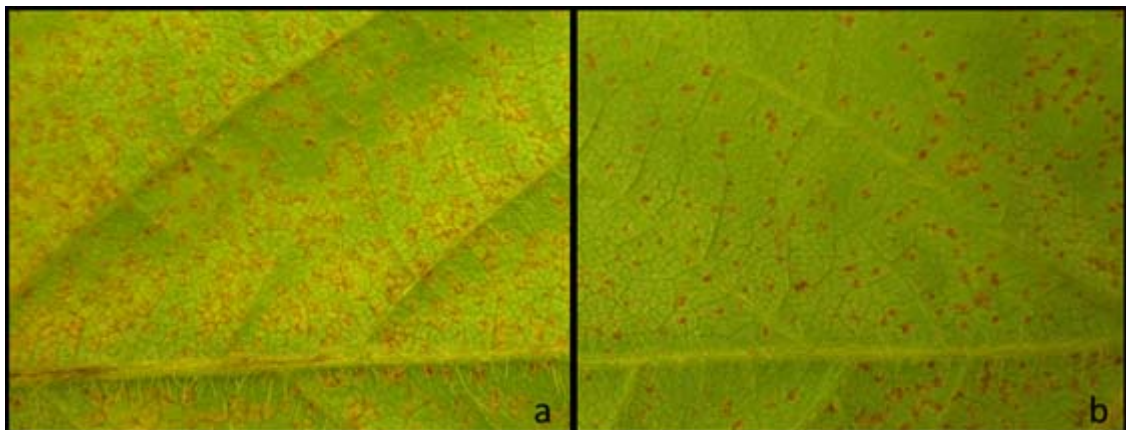


Figura 1 - Sintomas sobre a superfície foliar da soja, causadas pelo fungo da Ferrugem Asiática. (a) Lesões TAN no genótipo suscetível Embrapa 48. As lesões são amareladas e com alta produção de urédias e esporos. (b) Lesões RB no genótipo resistente PI 230970. As lesões são caracterizadas por uma cor marrom-avermelhada e com baixa produção de urédias e esporos.

A coleta dos voláteis nas plantas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi* foi iniciada 18 horas após a inoculação (hai) e transcorreu ao longo de 48 horas. Dessa forma, ao término do processo de obtenção de voláteis, às 66 hai, as folhas não apresentavam ainda nenhum sintoma da doença, o que era esperado visto que nesse período o processo infeccioso na planta não chegou a formar lesões visíveis na superfície foliar.

No entanto, mesmo na ausência de sintomas, a interação estabelecida entre a soja e *P. pachyrhizi* ocorre já em estágios iniciais do processo infeccioso (VAN DE MORTEL *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2008; SCHNEIDER *et al.*, 2011; STONE *et al.*,

2012). Assim, o período de obtenção dos voláteis, apesar de não corresponder a alterações fenotípicas, está associado a alterações de expressão gênica da planta. Isso levantou a hipótese de que, em teoria, com a alteração metabólica na planta, compostos orgânicos voláteis poderiam também, ter o seu perfil alterado, o que indicava uma amostragem em potencial para a identificação de biomarcadores associados ao patossistema Soja - *Phakopsora pachyrhizi*.

Foi observado que após a infecção da soja com o fungo *P. pachyrhizi*, um dos compostos orgânicos voláteis emitidos pela planta teve a sua produção reduzida, se comparado com plantas falso-inoculadas (Figura 2). Após a comparação entre os perfis cromatográficos, nenhum outro composto foi associado à presença de *P. pachyrhizi* nas folhas infectadas.

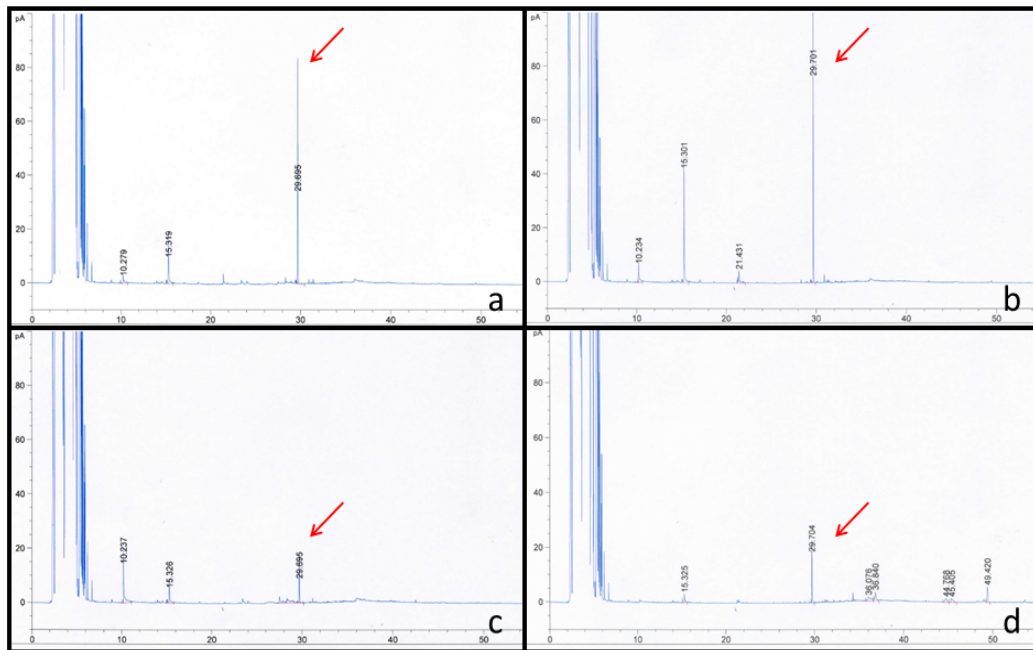


Figura 2 - Perfis cromatográficos de soluções de voláteis obtidos a partir de plantas de soja, genótipo Embrapa 48 (a, c) e PI 230970 (b, d). A seta indica o composto volátil que teve sua emissão reduzida após inoculação com do fungo. (a, b) Plantas de soja falso-inoculadas. (c, d) Plantas de soja inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi*.

Com o objetivo de identificar esse composto, foi realizada uma injeção de 4  $\mu$ L das soluções de voláteis em um MS-GC. Após uma comparação dos espectros obtidos com o banco de dados de massa espectral, o composto foi identificado (probabilidade superior a 70%) como sendo o metabólito (E,E)  $\alpha$ -farnesene.

A coinjeção entre uma solução de voláteis (2 $\mu$ L) e o padrão externo (E,E)  $\alpha$ -farnesene (2 $\mu$ L), permitiu a confirmação desse composto. O pico obtido no cromatograma foi único no tempo de retenção correspondente ao (E,E)  $\alpha$ -farnesene, confirmando, dessa forma, o resultado obtido após comparação com o banco de dados de massa espectral. A

co-injeção foi realizada em duas colunas diferentes, sendo uma coluna tipo DB-Wax e outra do tipo HP-1. O uso de diferentes colunas é importante para confirmar, sem ressalvas, o composto volátil, uma vez que o resultado obtido foi um pico único entre o composto de interesse e o padrão externo, mesmo após a injeção em diferentes colunas e equipamentos, o que elimina qualquer influência instrumental no resultado obtido.

Para verificar se existia correlação entre a quantidade de (E,E)  $\alpha$ -farnesene (definida em ng/ $\mu$ L - nanogramas/microlitro) produzida e nível de infecção da planta (baseado na porcentagem de Área Foliar Infectada – % AFI), plantas de soja submetidas à coleta de voláteis foram também avaliadas visualmente (Figura 3).

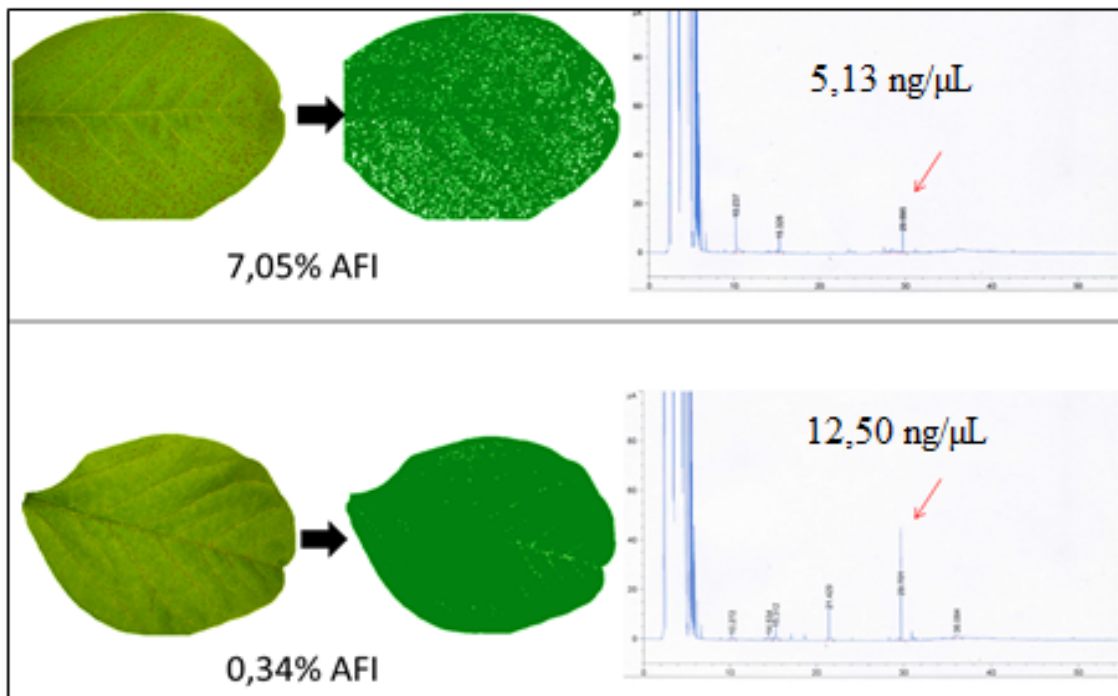


Figura 3 - Representação do cálculo de Área Foliar Infectada (AFI) em plantas de soja (Embrapa 48) inoculadas com a Ferrugem Asiática, 15 dias após a inoculação. Folíolos com maior nível visual de sintomas da doença foram convertidos em uma imagem onde as áreas infectadas foram substituídas por pontos brancos. A diferença entre a área foliar com e sem os sintomas permitiu calcular a porcentagem de AFI. O gráfico ilustra a relação entre o nível de sintomas da doença e a redução na emissão do volátil (E,E)  $\alpha$ -farnesene. Os cromatogramas representados foram obtidos a partir de voláteis coletados ao longo de 48 horas (18 a 66 horas após a inoculação).

Os resultados demonstraram que um menor nível de sintomas da doença estava relacionado com uma maior produção de (E,E)  $\alpha$ -farnesene, entre as plantas infectadas (tabela 1).

Tabela 1 - Percentagem de área foliar infectada em plantas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi* e a produção de (E,E) alfa-farnesene ao longo de 48 horas.

Embrapa 48			PI 230970		
Rep	% AFI	ng/ $\mu$ L de (E,E) alfa-farnesene	Rep	% AFI	pA do (E,E) alfa-farnesene
1	7,05	5,13	1	4,24	3,25
2	5,55	1,95	2	1,20	7,03
3	0,34	12,50	3	0,18	24,63
4	8,61	3,64	4	1,70	8,71

Rep = repetição; AFI = Área Foliar Infectada; ng/ $\mu$ L = nanogramas/microlitro

Pelo nosso conhecimento, esse é o primeiro relato de um sesquiterpeno como biomarcador de plantas de soja infectadas com a Ferrugem Asiática. Como mencionado anteriormente, ao término da coleta de voláteis as plantas eram fenotipicamente saudáveis. No entanto, com base na presença do composto volátil, era possível determinar com antecedência, qual planta apresentaria o menor nível de sintomas da doença.

Os sesquiterpenos são formados por três cadeias de isoprenos (terpenoides) e são derivados da fórmula molecular  $C_{15}H_{24}$  (CHEN *et al.*, 2011). (E,E)  $\alpha$ -farnesene é um sesquiterpeno acíclico, produzido pela via do Mevalonato (DUDAREVA *et al.*, 2005) (JU & CURRY, 2009), tendo como substrato o composto Farnesil Difosfato – FDP (figura 4).

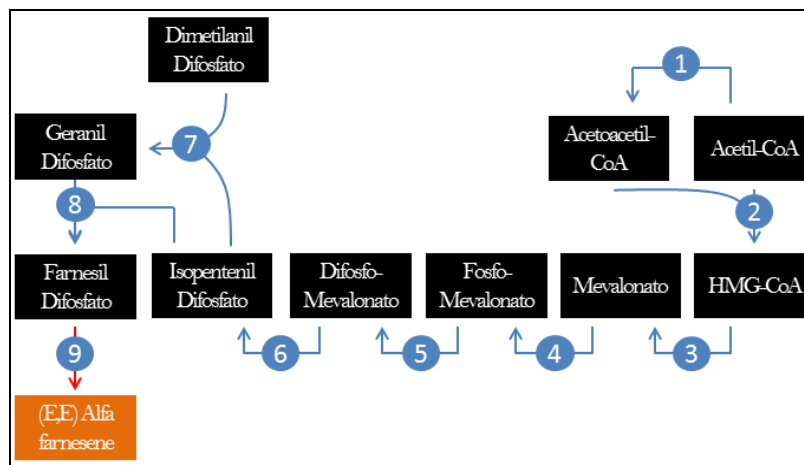


Figura 4 - Rota de biossíntese do (E,E)  $\alpha$ -farnesene. Os retângulos em preto representam os compostos utilizados como substratos e os círculos em azul representam as enzimas atuantes na rota metabólica. 1: Acetil-CoA Acetiltransferase (EC 2.3.1.9); 2: Hidroximetilglutaril-CoA sintase (EC 2.3.3.10); 3: 3-Hidroxi-3-Metilglutaril-CoA redutase (EC 1.1.1.34); 4: Mevalonato Quinase (EC 2.7.1.36); 5: Fosfomevalonato Quinase (EC 2.7.4.2); 6: Difosfomevalonato descarboxilase (EC 4.1.1.33); 7: Geranyl difosfato sintase (EC 2.5.1.1); 8: Farnesil pirofosfato sintase (EC 2.5.1.10); 9: (E,E) alfa-farnesene sintase (EC 4.2.3.46). EC: Classificação da Enzima (*Enzyme Classification*). A representação da rota de biossíntese foi elaborada a partir de informações do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

De acordo com a literatura, a produção de etileno está envolvida na regulação da síntese do (E,E)  $\alpha$ -farnesene em outras espécies de plantas. Maçãs e peras tratadas com 1-Metilciclopropeno - 1-MCP (um bloqueador irreversível de sítios receptores do hormônio) tiveram uma redução drástica na produção do volátil (PECHOUS *et al.*, 2005; GAPPER *et al.*, 2006). Essa observação abre um campo a ser explorado no patossistema Soja - *P. pachyrhizi*, a fim de elucidar se a via de sinalização do etileno esta diretamente ligada aos mecanismos de defesa impostos pela planta, considerando a supressão de (E,E) alfa-farnesene após a infecção com a Ferrugem Asiática.

Ainda permanece obscuro se (E,E)  $\alpha$ -farnesene possui algum papel direto no processo de defesa contra *P. pachyrhizi*, ou se a redução do composto foi uma consequência da supressão de genes atuante na sua rota metabólica. Estudando o patossistema *Arabidopsis thaliana* - *Pseudomonas syringae*, ATTARAN *et al.* (2008) identificaram a emissão de volátil (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridcatetraene (TMTT) em resposta à infecção de *P. syringae*. Porém, os autores concluíram que o composto induzido na presença do patógeno era um subproduto da sinalização do ácido jasmônico, e não uma resposta de defesa efetiva que contribuía para a resistência contra *P. syringae*.

Como mencionado anteriormente, é possível que a redução do (E,E)  $\alpha$ -farnesene seja devido à supressão de genes atuantes na rota metabólica. Transcritos de Mevalonato-quinase e Fosfomevalonato-quinase foram drasticamente reduzidos em plantas de soja suscetíveis inoculadas com *P. pachyrhizi* (TREMBLAY *et al.*, 2011). Essas enzimas estão na rota de biossíntese do Isopentenil difosfato, um componente -chave para a biossíntese formação do (E,E)  $\alpha$ -farnesene (Figura 4), e componente chave da biossíntese de metabólitos secundários. No entanto, essa supressão de transcritos foi obtida a partir de plantas em estágio tardio do processo de infecção (10 dai). Transcritos de Difosfomevalonato descarboxilase (MDC), enzima atuante na conversão do Difosfomevalonato em Isopentenil difosfato (IPP), também foram suprimidos em plantas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi* (CHOI *et al.*, 2008). Foi observada também uma expressão diferencial do transcrito de MDC 6 hai, seguida de uma supressão após 48 horas. Esse perfil de expressão gênica foi obtido em uma resposta imune (PI200492 – *Rpp1*) a *P. pachyrhizi* (CHOI *et al.*, 2008).

O período de obtenção dos voláteis no presente estudo (18 a 66 hai) compreende um intervalo onde a expressão gênica em plantas de soja resistentes (PI 230970) e suscetíveis (Embrapa-48) infectadas com o fungo da ferrugem foram semelhantes ao perfil apresentado por plantas falso-inoculadas (VAN DE MORTEL *et al.*, 2007). Isso indica que os sinais

emitidos para redução do (E,E) alfa-farnesene provavelmente ocorreram nos estágios iniciais do processo de infecção da Ferrugem Asiática.

Estudos demonstraram que o terpenoide Farnesil Acetato, emitido por plantas de fava (*Vicia faba* L.) após inoculação com o fungo *Uromyces fabae*, regula negativamente o desenvolvimento haustorial de *P. pachyrhizi*. A formação de colônias de *P. pachyrhizi* foi reduzida em 98% após aplicação externa desse composto. No entanto, não está claro se o fenótipo foi decorrente de uma ação direta do volátil na ativação de mecanismos de defesa ou se o composto em si teve o efeito inibitório (MENDGEN *et al.*, 2006).

No presente estudo, os testes realizados com folha de soja destacadas e inoculadas com a FAS, não permitiram inferir nenhum efeito do volátil (E,E)  $\alpha$ -farnesene sob o processo infeccioso de *P. pachyrhizi*. As folhas desenvolveram sintomas da doença por volta do sétimo a oitavo dia após a inoculação, caracterizadas como lesões TAN no genótipo Embrapa 48 e lesões do tipo RB no genótipo PI 230970, tanto nas placas nas quais foram adicionadas soluções de (E,E)  $\alpha$ -farnesene quanto nas placas utilizadas como controle (discos foliares contendo apenas o solvente hexane). No entanto, novos testes precisam ser executados, principalmente no que diz respeito a uma eficiente forma de diluição do composto para aplicação em folhas de soja.

O esclarecimento de vias de biossíntese e mecanismos regulatórios dos terpenóides em plantas e a compreensão da rota dos metabólitos secundários poderá fornecer uma nova luz no desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Um sistema de monitoramento que detecta plantas doentes em um estágio inicial pode permitir a ação de medidas efetivas. Para identificar o agente por meio da medição de COVs, a emissão de uma substância química específica ou um tempo de curso específico do COV induzido é requerido (JANSEN *et al.*, 2011).

Novas abordagens devem ser adotadas para testar o efeito do (E,E)  $\alpha$ -farnesene sobre o processo de infecção causado por *P. pachyrhizi*. A viabilidade de uma solução na qual esse composto possa ser diluído pode vir a ser uma alternativa atraente para o estudo fenotípico de plantas de soja infectadas com a FAS. Estudos moleculares também podem ser atrativos, por intermédio da identificação e estudo dos níveis de expressão das enzimas presentes na rota metabólica do (E,E)  $\alpha$ -farnesene, correlacionando aos dados obtidos no presente estudo, onde esse composto em questão foi associado como uma marca bioquímica de plantas infectadas com *P. pachyrhizi*.

## 5.5 - Referências Bibliográficas

- ANDRADE, P.J.M.; ANDRADE, D.F.A.A. Controle Químico da Ferrugem Asiática da Soja. In **Ferrugem Asiática da Soja**. Editor: Laércio Zambolim. p.61-72, 2006.
- ARIMURA, G.; OZAWA, R.; SHIMODA, T.; NISHIOKA, T.; BOLAND, W.; TAKABAYASHI, J. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. **Nature**, v. 406, n. 6795, p. 512-515, 2000.
- ATTARAN, E.; ROSTÁS, M.; ZEIER, J. Pseudomonas syringae elicits emission of the terpenoid (E, E)-4, 8, 12-trimethyl-1, 3, 7, 11-tridecatetraene in Arabidopsis leaves via jasmonate signaling and expression of the terpene synthase TPS4. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 11, p. 1482-1497, 2008.
- BALDWIN, I. T.; HALITSCHKE, R.; PASCHOLD, A.; VON DAHL, C. C.; PRESTON, C. A. Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. **Science Signalling**, v. 311, n. 5762, p. 812-815, 2006.
- BLANDE, J. D.; TIIVA, P.; OKSANEN, E.; HOLOPAINEN, J. K. Emission of herbivore - induced volatile terpenoids from two hybrid aspen (*Populus tremula* × *tremuloides*) clones under ambient and elevated ozone concentrations in the field. **Global Change Biology**, v. 13, n. 12, p. 2538-2550, 2007.
- CARDOZA, Y. J.; ALBORN, H. T.; TUMLINSON, J. H. In vivo volatile emissions from peanut plants induced by simultaneous fungal infection and insect damage. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 1, p. 161-174, 2002.
- CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 212-229, 2011.
- CHOI, J. J.; ALKHAROUF, N. W.; SCHNEIDER, K. T.; MATTHEWS, B. F.; FREDERICK, R. D. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases. **Functional and Integrative Genomics**, v. 8, n. 4, p. 341-359, 2008.
- CLAY, K.; KOVER, P. X. The Red Queen Hypothesis and Plant/Pathogen Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 29-50, 1996.
- DUDAREVA, N.; ANDERSSON, S.; ORLOVA, I.; GATTO, N.; REICHEL, M.; RHODES, D.; BOLAND, W.; GERSHENZON, J. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 3, p. 933-938, 2005.
- EDWARDS, H. H.; BONDE, M. R. Penetration and establishment of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean leaves as observed by transmission electron microscopy. **Phytopathology**, v. 101, n. 7, p. 894-900, 2011.
- GAPPER, N.; BAI, J.; WHITAKER, B. Inhibition of ethylene-induced  $\alpha$ -farnesene synthase gene PcAFS1 expression in 'd' Anjou pears with 1-MCP reduces synthesis and oxidation of  $\alpha$ -farnesene and delays development of superficial scald. **Postharvest Biology and Technology**, v. 41, p. 225-233, 2006.
- HEATH, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 4, p. 315-319, 2000.
- HEIL, M.; SILVA BUENO, J. C. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 13, p. 5467-5472, 2007.
- HOEFLE, C.; LOEHRER, M.; SCHAFFRATH, U.; FRANK, M.; SCHULTHEISS, H.; HUCKELHOVEN, R. Transgenic suppression of cell death limits penetration success of the soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* into epidermal cells of barley. **Phytopathology**, v. 99, n. 3, p. 220-226, 2009.
- HUANG, M.; SANCHEZ-MOREIRAS, A. M.; ABEL, C.; SOHRABI, R.; LEE, S.; GERSHENZON, J.; THOLL, D. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)-beta-caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. **New Phytologist**, v. 193, n. 4, p. 997-1008, 2012.
- JANSEN, R. M.; WILDT, J.; KAPPERS, I. F.; BOUWMEESTER, H. J.; HOFSTEE, J. W.; VAN HENTEN, E. J. Detection of diseased plants by analysis of volatile organic compound emission. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 157-174, 2011.

- JU, Z.; CURRY, E. A. Lovastatin Inhibits  $\alpha$ -Farnesene Synthesis without Affecting Ethylene Production during Fruit Ripening in 'Golden Supreme' Apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 125, n. 1, p. 105-110, 2000.
- KEMEN, E.; JONES, J. D. G. Obligate biotroph parasitism: can we link genomes to lifestyles? **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 448-457, 2012.
- LAW, J. H.; REGNIER, F. E. Pheromones. **Annual Review of Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 533-548, 1971.
- LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; GOELLNER, K.; CONRATH, U.; SCHAFFRATH, U. Characterization of nonhost resistance of *Arabidopsis* to the Asian soybean rust. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 11, p. 1421-1430, 2008.
- MCLEAN, R. Histological studies of resistance to soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. **Crop and Pasture Science**, v. 30, n. 1, p. 77-84, 1979.
- MELLERSH, D. G.; HEATH, M. C. An investigation into the involvement of defense signaling pathways in components of the nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* to rust fungi also reveals a model system for studying rust fungal compatibility. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 5, p. 398-404, 2003.
- MENDGEN, K.; WIRSEL, S. G.; JUX, A.; HOFFMANN, J.; BOLAND, W. Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi. **Planta**, v. 224, n. 6, p. 1353-1361, 2006.
- MEYER, J. D. et al. Identification and analyses of candidate genes for *Rpp4*-mediated resistance to Asian Soybean Rust in soybean. **Plant Physiology**, v. 150, n. 1, p. 295-307, 2009.
- NIST, N. Mass Spectral Search for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0. **Office of the Standard Reference Data Base, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland**, 2005.
- PANDEY, A. K.; YANG, C.; ZHANG, C.; GRAHAM, M. A.; HORSTMAN, H. D.; LEE, Y.; ZABOTINA, O. A.; HILL, J. H.; PEDLEY, K. F.; WHITHAM, S. A. Functional analysis of the asian soybean rust resistance pathway mediated by *Rpp2*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 2, p. 194-206, 2011.
- PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores. **Plant Physiology**, v. 121, p. 325-31, 1999.
- PECHOUS, S. W.; WATKINS, C. B.; WHITAKER, B. D. Expression of  $\alpha$ -farnesene synthase gene AFS1 in relation to levels of  $\alpha$ -farnesene and conjugated trienols in peel tissue of scald-susceptible 'Law Rome' and scald-resistant 'Idared' apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, n. 2, p. 125-132, 2005.
- PICAUD, S.; BRODELIUS, M.; BRODELIUS, P. E. Expression, purification and characterization of recombinant (E)-beta-farnesene synthase from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 9, p. 961-967, 2005.
- PICKETT, J. A.; ARADOTTIR, G. I.; BIRKETT, M. A.; BRUCE, T. J. A.; CHAMBERLAIN, K.; KHAN, Z. R.; MIDEGA, C. A. O.; SMART, L. E.; WOODCOCK, C. M. Aspects of insect chemical ecology: exploitation of reception and detection as tools for deception of pests and beneficial insects. **Physiological Entomology**, v. 37, n. 1, p. 2-9, 2012.
- RÖSE, U. S. R.; TUMLINSON, J. H. Systemic induction of volatile release in cotton: How specific is the signal to herbivory? **Planta**, v. 222, n. 2, p. 327-335, 2005.
- SCHNEIDER, K. T.; VAN DE MORTEL, M.; BANCROFT, T. J.; BRAUN, E.; NETTLETON, D.; NELSON, R. T.; FREDERICK, R. D.; BAUM, T. J.; GRAHAM, M. A.; WHITHAM, S. A. Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlate with fungal penetration and haustoria formation. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 355-371, 2011.
- SKELTON, A.; CAMERON, M.; PICKETT, J.; BIRKETT, M. Identification of Neryl Formate as the Airborne Aggregation Pheromone for the American House Dust Mite and the European House Dust Mite (Acari: Epidermoptidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 798-804, 2010.
- SPOLTI, P.; GODOY, C. V.; DEL PONTE, E. M. Sumário da dispersão em larga escala das epidemias de ferrugem asiática da soja no Brasil em quatro safras (2005/06 a 2008/09). Londrina: Embrapa Soja (**Documentos 315**), p. 11-19, 2009.
- STONE, C. L.; MCMAHON, M. B.; FORTIS, L. L.; NUNEZ, A.; SMYTHERS, G. W.; LUSTER, D. G.; FREDERICK, R. D. Gene expression and proteomic analysis of the formation of *Phakopsora pachyrhizi* appressoria. **BMC Genomics**, v. 13, p. 269, 2012.
- TAMIRU, A.; BRUCE, T. J. A.; MIDEGA, C. A. O.; WOODCOCK, C. M.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; KHAN, Z. R. Oviposition induced volatile emissions from African smallholder farmers' maize varieties. **Journal of Chemical Ecology**, p. 1-4, 2012.

- TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N. W.; LI, S.; MATTHEWS, B. F. Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 183-193, 2010.
- TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N. W.; LI, S.; MATTHEWS, B. F. Gene Expression in Leaves of Susceptible *Glycine max* during Infection with *Phakopsora pachyrhizi* Using Next Generation Sequencing. **Sequencing**, v. 2011, p. 1-14, 2011.
- VAN DE MORTEL, M.; RECKNOR, J. C.; GRAHAM, M. A.; NETTLETON, D.; DITTMAN, J. D.; NELSON, R. T.; GODOY, C. V.; ABDELNOOR, R. V.; ALMEIDA, Á. M. R.; BAUM, T. J. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 8, p. 887-899, 2007.
- YORINORI, J.T.; NUNES JÚNIOR, J.; LAZZAROTTO, J.J. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. Londrina: Embrapa Soja. 36p. (**Documentos, 247**), 2004.
- WEBSTER, B.; BRUCE, T.; DUFOUR, S.; BIRKEMEYER, C.; BIRKETT, M.; HARDIE, J.; PICKETT, J. Identification of volatile compounds used in host location by the black bean aphid, *Aphis fabae*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 9, p. 1153-1161, 2008.



### 5.7 - Anexo 2

Recipiente de vidro (60 cm de altura x 15 cm de diâmetro interno), aberto na parte inferior e com duas aberturas de coleta, uma na parte lateral (para a entrada do ar) e outra na parte superior (para saída). O fundo foi fechado sem pressão ao redor do caule da planta, utilizando duas placas de alumínio semicircular com um furo no centro para acomodar a haste.



## 6 - ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA INDUZIDO DE *PHASEOLUS LUNATUS* DURANTE INTERAÇÃO COM *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* E CORRELAÇÃO COM OS EVENTOS DE PENETRAÇÃO DO FUNGO

Salvador L. Brito Júnior<sup>1</sup>; Aguida M. A. P. Morales<sup>2</sup>; Valéria S. L. Caitar<sup>2</sup>; Cynara C. R. Teixeira<sup>2</sup>; Lívia M. Nogueira<sup>2</sup>; Leandro C. Nascimento<sup>3</sup>; Marcelo F. Carazzolle<sup>3</sup>; Francismar C. Marcelino-Guimarães<sup>2</sup>; Ricardo V. Abdelnoor<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

<sup>2</sup> Embrapa Soja, Londrina-PR, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas-SP, Brasil.

### 6.1 - Resumo

Ferrugem Asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* é uma doença foliar presente em quase todas as áreas produtoras de soja. O feijão-lima (*Phaseolus lunatus*) é uma fonte alternativa de resistência à ferrugem asiática e dessa forma um potencial candidato à identificação de genes atuantes na defesa contra o fungo. Assim, para identificar genes atuantes na resistência contra esse patógeno, foi obtido o transcriptoma de folhas de *P. lunatus* infectadas com *P. pachyrhizi*. O processo de infecção foi correlacionado a importantes genes de defesa com ação antifúngica. O fungo promoveu a penetração e colonização do mesófilo de *P. lunatus*, porém não foi observado esporulação. Transcritos relacionados à biossíntese de fenilpropanóides foram identificados desde as etapas de germinação de *P. pachyrhizi* 3-6 horas após a inoculação (hai) até a fase de colonização do mesófilo (48-96 hai). Concomitante à presença de hifas no mesófilo foliar, foi observada a indução de um transcrito relacionado a um gene R com domínio NBS-LRR. Associado à presença desse gene R foi observado a indução de proteínas relacionadas à patogenicidade (PR) com ação antifúngica, quitinases, beta 1,3-glucanase e defensinas *Phaseolus lunatus* apresentou uma defesa pós-haustorial impedindo o sucesso da relação parasitária. Os transcritos identificados e relacionados ao processo de defesa da planta podem vir a ser utilizados em programas de melhoramento, por meio de técnicas de engenharia genética, para obtenção de cultivares com resistência genética efetiva contra a ferrugem asiática da soja.

**Palavras-chave:** Hospedeiro alternativo, Genes de Resistência, Interação Molecular Planta-Patógeno, Interação Incompatível.

## 6.2 - Introdução

A soja (*Glycine max*) é uma cultura de grande importância econômica mundial e uma excelente fonte de proteínas, óleos e nutriente. O continente americano concentra os principais países produtores da cultura, com destaque para o Brasil e os Estados Unidos.

A Ferrugem Asiática da Soja (FAS), uma doença foliar causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, tem provocado sérios danos à cultura da soja, com perdas de produção chegando a 70% da área cultivada (OGLE *et al.*, 1979; YORINORI *et al.*, 2005). *Phakopsora pachyrhizi* é um fungo biotrófico que em estágios avançados da doença, promove a queda foliar e a natural redução da taxa fotossintética. Dessa forma, leva a um comprometimento do enchimento dos grãos e a consequente queda na produção (SINCLAIR, 1989).

O fungo foi descrito pela primeira vez no Japão em 1902 (HENNING, 1903) e um século depois atingiu o continente Sul-americano, sendo identificado em lavouras do Paraguai e Brasil, em 2001 (YORINORI *et al.*, 2005). Nas safras subsequentes a FAS foi responsável por perdas expressivas na produção da cultura nesses países, se disseminando para Argentina, Bolívia e Uruguai (ROSSI, 2003; STEWART *et al.*, 2005). Em 2004, o patógeno foi identificado em lavouras nos Estados Unidos (SCHNEIDER *et al.*, 2005) e hoje está presente na maioria das áreas produtoras de soja, sendo considerado mundialmente, um dos principais patógenos prejudiciais do agronegócio.

Seis loci de resistência (*Rpp1* a *Rpp6*) foram identificados em genótipos de soja, conferindo uma resistência parcial ao patógeno (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; MCLEAN & BYTH, 1980; HARTWIG & BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986; GARCIA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012). Somente o locus *Rpp1* tem sido relatado com fenótipo imune a alguns isolados (RAY *et al.*, 2009). Na maioria dos genótipos resistentes, o fungo completa o seu ciclo de vida, porém com uma produção de esporos reduzida se comparado com genótipos suscetíveis (TWIZEYIMANA & HARTMAN, 2010). Nenhuma cultivar comercial de soja possui uma efetiva resistência a todos os isolados do patógeno, e o controle da doença fica restrito à aplicação de fungicidas e manejo da cultura.

Contínuos esforços têm sido realizados para a identificação de novos genótipos de soja portadores de genes de resistência à FAS. No entanto, está claro que a identificação de fontes alternativas de resistência à FAS é uma opção atraente no que diz respeito à identificação de genes importantes no processo de defesa da planta, buscando uma resistência efetiva e duradoura contra o patógeno (SLAMINKO *et al.*, 2008; SORIA-GUERRA *et al.*, 2010).

Trabalhos têm sido realizados utilizando plantas não hospedeiras à *P. pachyrhizi*, tais como *Arabidopsis thaliana* e *Medicago truncatula*. Avanços têm sido obtidos com a identificação de genes e rotas metabólicas importantes no processo de defesa da planta (LOEHRER *et al.*, 2008; UPPALAPATI *et al.*, 2012).

Em 2005, foi observado que *P. pachyrhizi* infecta plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) nos EUA (LYNCH *et al.*, 2006). O feijão comum é hospedeiro principal de outro fungo causador de ferrugem (*Uromyces appendiculatus*). Estudos mostraram que plantas de *P. vulgaris* infectadas com a FAS produziram os sintomas da doença sendo o fungo capaz de completar o seu ciclo de vida (MILES *et al.*, 2007). No entanto, outra planta do gênero *Phaseolus*, o feijão-lima (*Phaseolus lunatus*), foi relatada como uma potencial fonte de resistência à FAS, uma vez que o fungo não consegue completar o seu ciclo de vida, sendo observadas raras esporulações do patógeno (BONDE *et al.*, 2008). A elucidação de mecanismos de defesa em plantas de *P. lunatus* infectadas com a ferrugem da soja, pode levar à identificação de novos genes para resistência à *P. pachyrhizi*.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar fenotipicamente os eventos de pré-penetração e penetração de *P. pachyrhizi* em plantas de feijão-lima (*P. lunatus*) e caracterizar o transcriptoma de feijão-lima durante a interação com a ferrugem asiática. Para este fim, foram utilizadas técnicas de microscopia ótica e eletrônica, e o método RNA-Seq com posteriores análises *in silico*, para a obtenção de informações referentes à funcionalidade dos genes de perfil relevante, durante as respostas precoces e intermediárias de defesa da planta.

### 6.3 - Material e Métodos

#### 6.3.1 - Análise fenotípica da interação entre *Phakopsora pachyrhizi* e *Phaseolus lunatus*.

Sementes de feijão-lima (variedades: Branca Maior, Branca Menor, Orelha-de-Vó e Rajada Vermelha) foram semeadas, em casa de vegetação ( $24 \pm 4^{\circ}\text{C}$ ; 50 a 60% de umidade e 12h/12h de fotoperíodo), em vasos individuais contendo cinco plantas por vaso. As plantas foram inoculadas 25 dias após a semeadura, com uma população de uredósporos de *P. pachyrhizi*, obtidas a partir de plantas de soja suscetíveis ao fungo (Embrapa 48) previamente inoculadas, mantidas em casa de vegetação separada, na Embrapa-Soja, Londrina-PR. Os esporos coletados foram utilizados no preparo da suspensão feita com água esterilizada contendo 0,01% de Tween20 (v/v) e diluídos a concentração final de  $20 \times 10^4$  esporos/mL. Após a inoculação, as plantas foram recobertas com saco plástico, por um período de 24 horas, para fornecer condições de temperatura e umidade, ideais para o processo de infecção. Avaliações fenotípicas macroscópicas foram realizadas diariamente até oito dias após a inoculação (dai) e posteriormente 15 e 21dai, a fim de confirmar a presença e/ou ausência de lesões, bem como os tipos RB e/ou TAN. Plantas de soja, genótipo PI 230970 e Embrapa-48, foram utilizadas como controle fenotípico.

#### 6.3.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura

A partir das plantas utilizadas para análise fenotípica, fragmentos foliares ( $0,5 \text{ cm}^2$ ) foram coletados 6, 24 e 360 hai, e fixados em FAA 50% - Formaldeído:Ácido Acético:Etanol 50% (18:1:1 v:v:v) e mantidos a  $4^{\circ}\text{C}$  por pelo menos 48 horas. Posteriormente, os fragmentos foliares de feijão-lima e soja foram retirados da solução fixadora, lavadas em tampão fosfato 0,1M e submetidas à desidratação em série alcoólica (JOHANSEN, 1940). Após a desidratação, as amostras foram processadas em secador de ponto crítico de  $\text{CO}_2$  (CPD 030 Critical Point Dryer – BALTEC), montadas em suportes metálicos (*stubs*) e metalizadas com camada de ouro. As eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura, equipados com detector de elétrons secundários e retro espelhados (para alto e baixo vácuo) e de sistema de espectroscopia de raios X por dispersão de energia para microanálises.

### **6.3.3 - Inoculação de uredósporos de *P. pachyrhizi* em folhas destacadas e análises citológicas**

Folhas de feijão e soja obtidas de plantas com 25 dias de idade foram destacadas e inoculadas com suspensão contendo uredósporos de *P. pachyrhizi* ( $2 \times 10^4$  esporos/mL), conforme procedimento descrito por MAGNANI *et al.* (2007).

Fragmentos foliares foram coletados 6, 12, 24, 48 e 72 hai, fixados em FAA 50% e mantidos a 4°C por pelo menos 48 horas. Para a visualização das estruturas do fungo na superfície celular, as amostras foram clareadas e coradas de acordo com WOLF & FRIC (1981) e visualizadas em microscópio ótico Leica DMLB. Para a estimativa da porcentagem de germinação e formação de apressório, dois segmentos foliares de cada um dos genótipos avaliados foram corados com *Coomassie Blue* e analisados em 12 campos microscópicos por segmentos. Foi realizada análise de variância em parcela subdividida, utilizando como repetições as médias obtidas em cada segmento foliar. As médias foram analisadas pelo teste t ao nível de 5% de significância. Para a visualização de hifas no interior do mesofilo, foi utilizado clareamento foliar utilizando hipoclorito de sódio 0,75% e as imagens foram visualizadas em microscópio ótico Olympus BX50 acoplado com lentes de contraste de fase. Todas as imagens foram obtidas com câmera Moticam 2300 3.0MP Live Resolution.

### **6.3.4 - Obtenção de tecido foliar para análises de sequenciamento**

Sementes de feijão-lima (variedade Branca Maior) foram semeadas em casa de vegetação (sob as mesmas condições descritas anteriormente) em vasos individuais contendo duas plantas por vaso. As plantas foram inoculadas 25 dias após o plantio com uma suspensão de esporos de *P. pachyrhizi* preparadas conforme descrito para as avaliações fenotípicas. Para as plantas controle (falso-inoculadas) foi utilizada uma suspensão contendo água e 0,01% de tween20. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 três repetições por tratamento. O segundo trifólio de cada planta foi coletado em tempos estabelecidos (3, 6, 12, 24, 48 e 96 hai). Imediatamente após a coleta, o trifólio foi envolvido em papel alumínio, acondicionado em nitrogênio líquido e transferido para freezer -80 °C até a sua utilização.

### 6.3.5 - Obtenção do RNA e construção dos *Bulks* para sequenciamento

Cada uma das três repetições por tratamento foi macerada separadamente. O RNA total foi isolado utilizando-se o kit de extração TRIZOL<sup>®</sup> (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA) e quantificado por espectrofotômetro Uniscience NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). As amostras de RNA foram tratadas com desoxirribonuclease I (Kit DNase I *Invitrogen*) e a eficiência do isolamento do RNA total foi testada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio (EtBr). Para a construção das bibliotecas, as amostras de RNA total foram agrupadas em 6 *bulks*, conforme o tempo de coleta e tipo de inoculação (Figura 1). Cada *bulk* foi composto de quantidades equivalentes a 3 µg de RNA total de cada repetição.

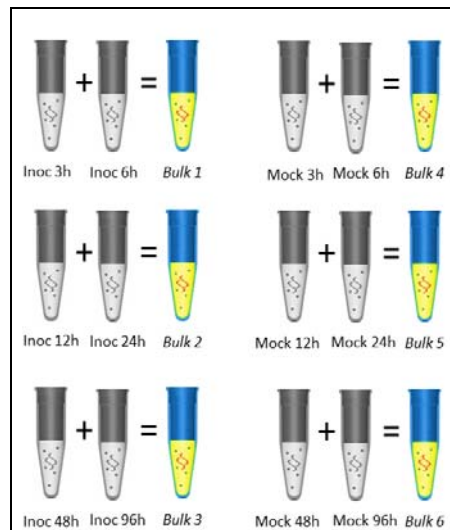


Figura 1 - Diagrama esquemático da metodologia utilizada para a formação dos bulks de expressão.

As bibliotecas foram sequenciadas em modo *single end*, pela empresa MACROGEN, utilizando a plataforma HiqSeq2000 (Illumina), capaz de gerar fragmentos (*reads*) de 100 pares de base (bp). Posteriormente, os *reads* foram analisados no laboratório de bioinformática e Biotecnologia Vegetal da Embrapa/Soja em conjunto com o laboratório de Genômica e Expressão da Unicamp.

### 6.3.6 - Montagem do transcriptoma e cálculo do nível de expressão dos *contigs*

Os *reads* gerados pela plataforma de sequenciamento foram filtrados para a exclusão das sequências dos adaptadores da plataforma Illumina, *reads* de baixa qualidade ( $\text{Phred} \leq 20$ ) e altamente-repetitivos. Após a filtragem de todas as bibliotecas, os *reads* foram utilizados para a montagem *de novo* do transcriptoma de *Phaseolus lunatus* utilizando o programa Trinity (GRABHERR *et al.*, 2011). Os transcritos preditos para o transcriptoma de feijão-lima, provenientes da montagem *de novo*, foram utilizados

como referencia para o cálculo de nível de expressão de cada *contig*, em cada biblioteca, através do programa RSEM (LI & DEWEY, 2011). Para o cálculo de nível de expressão dos genes, em cada tratamento, utilizou o número de *reads* que alinharam no mesmo *contig*, de acordo com a fórmula a seguir:  $FPKM = (N * 10^9) / S * T$  (FPKM = Fragmentos por kilobase de exon por milhão de *reads* mapeados; N = Número de *reads* (fragmentos) mapeados em um transcrito; S = tamanho do transcrito; e T = Total de *reads* mapeados da biblioteca).

### 6.3.7 - Categorização funcional e identificação de *contigs* diferencialmente expressos

Os *contigs* foram comparados com um banco de dados de proteínas não-redundantes do NCBI por meio de um Blast X (ALTSCHUL *et al.*, 1997), para a busca de similaridade com proteínas conhecidas. Foram empregadas as sequências nucleotídicas traduzidas dos transcritos de feijão contra as sequências proteicas do banco de dados Uniprot com nível de significância E-value  $\leq 10^{-5}$ . O programa *Blast2GO* (CONESA *et al.*, 2005) foi utilizado para classificar automaticamente os *contigs* de acordo com a função molecular e processo biológico descrito para as respectivas proteínas identificadas (GÖTZ *et al.*, 2008; CARBON *et al.*, 2009). Para a identificação de transcritos diferencialmente expressos, os dados de expressão foram analisados sobre uma base gene a gene, utilizando o pacote de estatística computacional R DEseq (ANDERS & HUBER, 2010). Cada análise foi baseada em uma comparação do nível de expressão do transcrito, obtido usando o cálculo de FPKM, entre as bibliotecas dos tratamentos inoculado e controle, dentro do mesmo tempo. Somente foram considerados transcritos diferenciais, aqueles que apresentaram confiança ao nível de significância de 1% (*p-adjusted*) e com *fold-change* de FPKM  $\leq -2$  ou  $\geq 2$ . *Fold-change* é número referente a razão (quantidade de alterações) entre um valor final e um valor inicial; sua base de calculo é FPKM do tratado / FPKM do controle.

### 6.3.8 - Filtragem dos transcritos diferencialmente expressos

Todas as sequências que não receberam pelo menos uma anotação para genes de planta foram removidas dos transcritos diferencialmente expressos.

## 6.4 – Resultados

### 6.4.1 - Caracterização fenotípica das variedades de feijão-lima inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi*

Todos os genótipos de *P. lunatus* analisados apresentaram áreas necrosadas, entre cinco e seis dias após a inoculação (dai), no entanto, não foi observado esporulação nas lesões. As plantas de soja, utilizadas como controle, desenvolveram lesões do tipo RB no genótipo PI 230970 (que carrega o gene de resistência *Rpp2*), e lesões do tipo TAN, em Embrapa 48, confirmando a eficiência do processo de inoculação. As lesões em plantas de soja surgiram entre sete e oito dias após a inoculação (dai), sendo observada esporulação do material por volta do 11º dai (Figura 2).

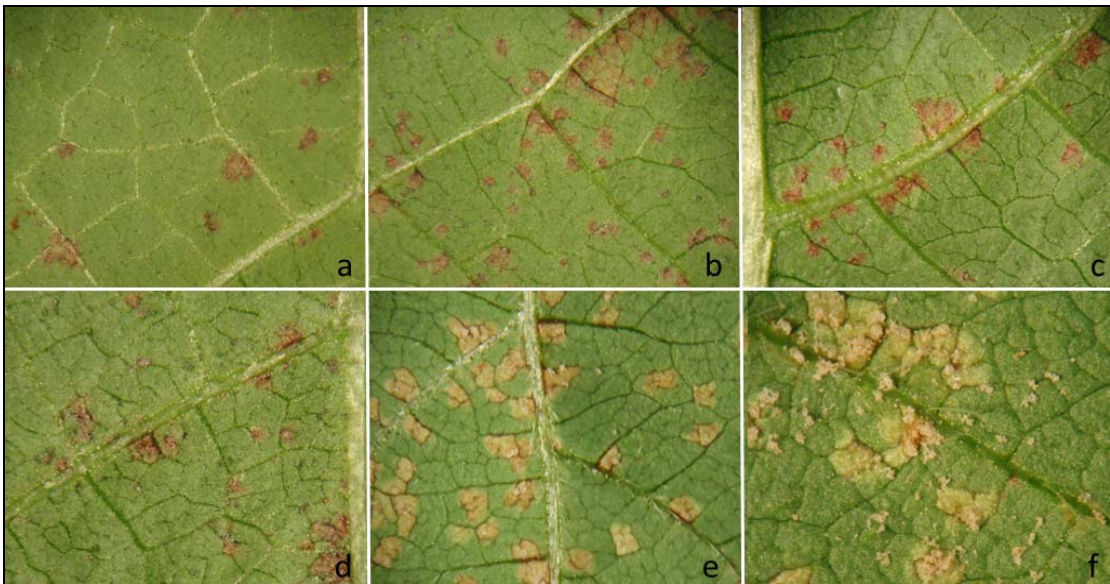


Figura 2 - Respostas fenotípicas de *Phaseolus lunatus* e *Glycine max* após inoculação com *P. pachyrhizi*. Pontos necrosados são visualizados na superfície foliar de *P. lunatus* decorrentes da inoculação de *P. pachyrhizi*. *Glycine max* apresentaram lesões do tipo RB e TAN. A: *P. lunatus* “Branca Maior”. B: *P. lunatus* “Branca Menor”. C: *P. lunatus* “Orelha-de-Vó”. D: *P. lunatus* “Rajada Vermelha”. E: *G. max* PI 230970. F: *G. max* Embrapa 48.

A fim de visualizar as estruturas formadas pelo fungo, na superfície das folhas de *P. lunatus*, foi realizada análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Transcorrido 6 hai, o fungo havia germinado e desenvolvido o apressório, estrutura importante no processo de infecção de *P. pachyrhizi*. Preferencialmente o apressório foi formado nas junções celulares e a penetração ocorreu na periferia celular (Figura 3a,b). As lesões apresentadas por *P. lunatus* permitiram a obtenção de cortes longitudinais de segmentos foliares de 15 dai, que analisados por MEV, revelaram um tecido com grande proliferação de hifas (Figura 3c,d).

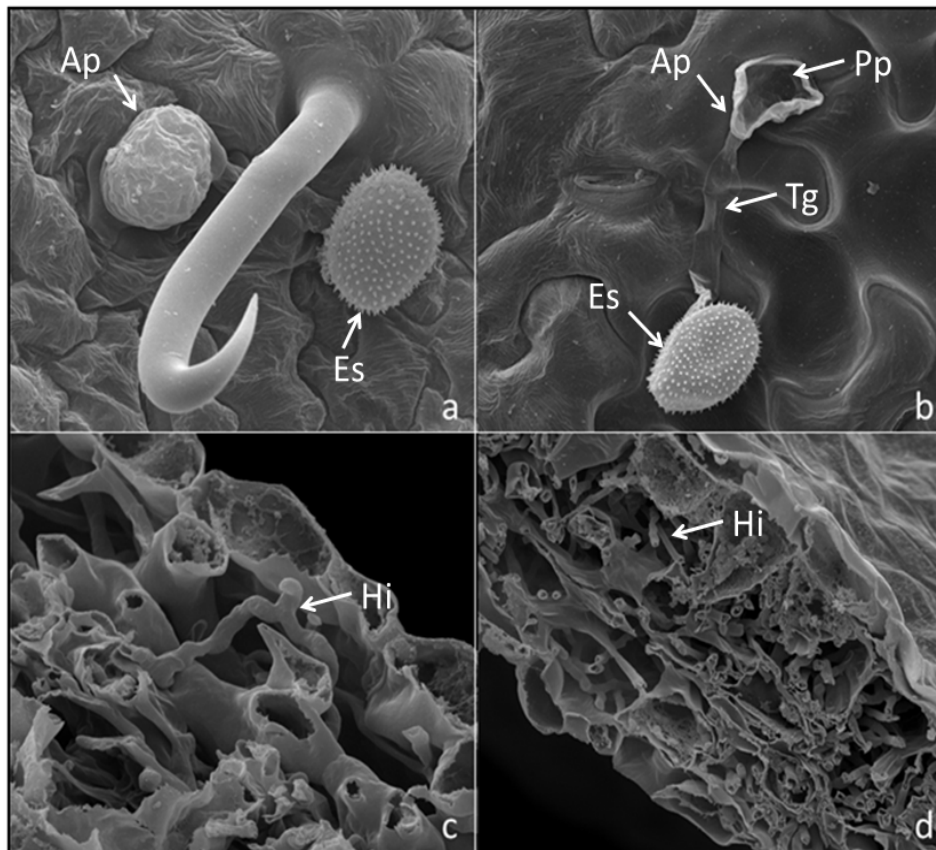


Figura 3 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *Phakopsora pachyrhizi* na superfície foliar de *Phaseolus lunatus* e a visualização de hifas no interior do mesófilo. O posicionamento do apressório ocorreu nas junções celulares (a) e o ponto de penetração foi observado na periferia celular (b). Quinze dias após a inoculação, o mesófilo do feijão-lima estava colonizado por hifas de *P. pachyrhizi* (c,d). Es: Esporo; Tg: Tubo germinativo; Ap: Apressório; Pp: Ponto de penetração; Hi: Hifas.

As análises de microscopia ótica demonstraram que os esporos de *P. pachyrhizi* apresentaram um percentual de germinação superior a 80%, transcorridas 6 hai. Em 24 hai, todos os esporos visualizados nos 12 campos analisados por segmento foliar já haviam germinado. No entanto foi observado um comportamento diferenciado entre os genótipos, referente à formação do apressório. Todos os genótipos de *P. lunatus* apresentaram a mesma porcentagem de formação de apressório, nos 12 sítios de interação analisado. O mesmo não ocorreu com os genótipos de *G. max*. Embrapa 48 apresentou uma porcentagem maior, entretanto não havendo diferença entre os horários analisados. PI 230970, por sua vez, apresentou a menor porcentagem de formação de apressório em 6 hai, e a partir de 12 hai se comportou semelhante à *P. lunatus*. Com exceção da Embrapa 48, todos os outros genótipos apresentaram um acréscimo na formação de apressórios em 12 hai, mantendo esse percentual ao longo dos tempos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de formação de apressório de *Phakopsora pachyrhizi* em *Phaseolus lunatus* e *Glycine max*.

Genótipos		% formação de apressório		
		6hai	12hai	24hai
<i>P. lunatus</i>	B. Maior	41,50 bB	62,00 bA	63,35 bA
	B. Menor	42,75 bB	60,95 bA	61,80 bA
	Orelha-de-Vó	41,00 bB	61,00 bA	63,45 bA
	RajadaVermelha	41,85 bB	61,55 bA	62,65 bA
<i>G. max</i>	PI 230970	30,05 c	60,50 b	67,80 b
	Embrapa 48	80,30 aA	80,22 aA	83,10 aA

Números seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste t ( $\alpha$  5%). Letras maiúsculas representaram comparações horizontais. Letras minúsculas representam comparações verticais.

Durante o desenvolvimento do apressório, foi observada uma projeção do mesmo, que possivelmente indica o local de fixação. A visualização dessa estrutura foi possível por coloração em *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) (Figura 4), e aponta que, conforme observado na MEV, os apressórios foram fixados preferencialmente nas junções celulares.

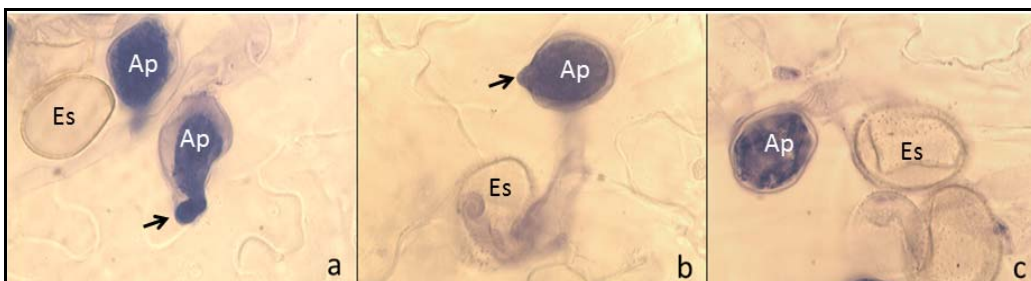


Figura 4 - Processo completo de germinação de *P. pachyrhizi* na superfície foliar de feijão-lima (a) e soja (b,c). As setas indicam uma projeção do apressório próximo à junção celular, possível ponto de fixação (a,b). Es: Esporo; Ap: Apressório.

Em todos os genótipos avaliados, *P. pachyrhizi* iniciou o processo de penetração 6 hai, sendo observados pontos de perfuração no tecido foliar próximos às junções celulares. Transcorrida 12 horas da inoculação, foi possível visualizar a formação da hifa primária de infecção. A colonização do mesofilo avançou nas horas subsequentes, sendo que em 72 hai foi possível observar o mesofilo bem colonizado por hifas septadas de *P. pachyrhizi* em todas as espécies (Figura 5).

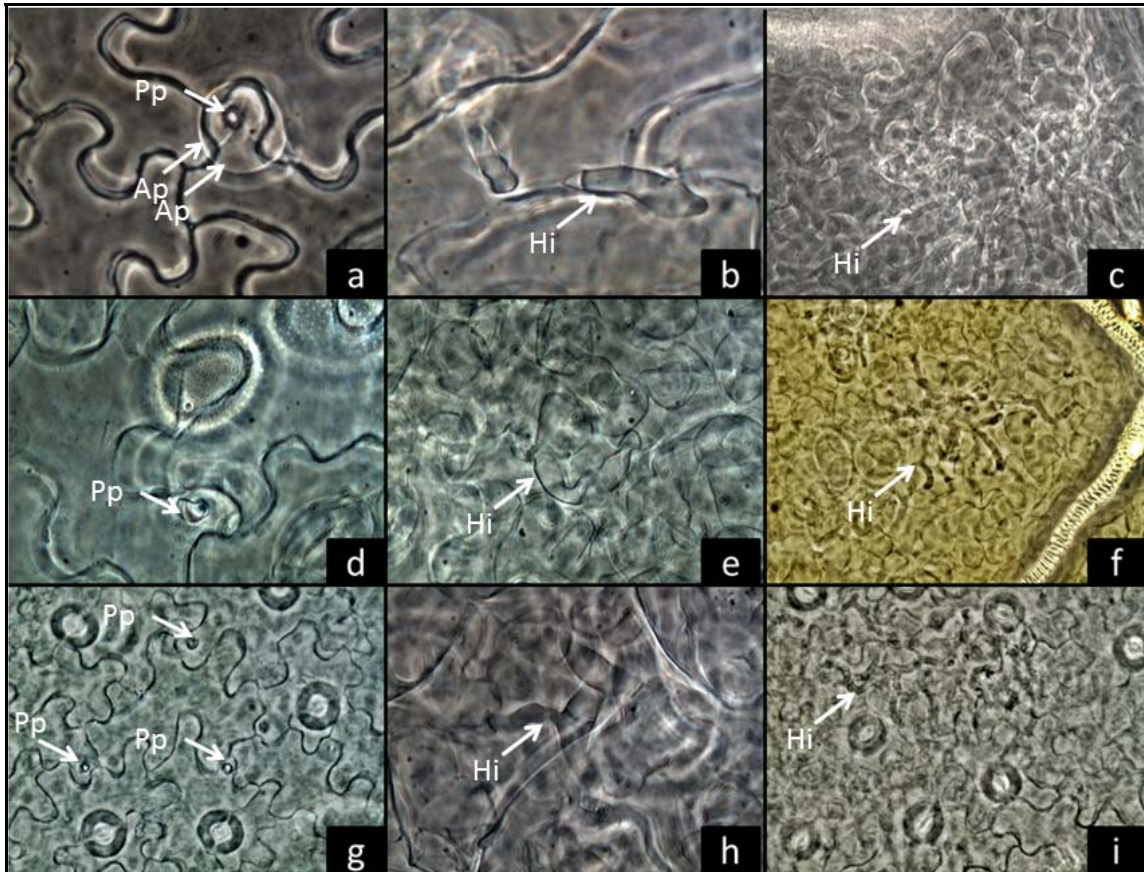


Figura 5 - Visualização do ponto de infecção e hifas de *Phakopsora pachyrhizi* em *Phaseolus lunatus* e *Glycine max*. Segmentos foliares visualizados em microscópio óptico de contraste de fase. a,b,c - *P. lunatus*, 6, 12 e 72 hai, respectivamente. d,e,f - *G. max* PI 230970, 6, 12 e 72 hai, respectivamente. g,h,i - *G. max* Embrapa 48, 6, 12 e 72 hai, respectivamente. Pp: Ponto de penetração. Hi: Hifas.

#### 6.4.2 - Análise do transcriptoma de folhas de *Phaseolus lunatus* infectadas com *Phakopsora pachyrhizi*

O transcriptoma de feijão-lima (*P. lunatus*), proveniente das 6 bibliotecas, gerou um total de 243.286.361 *reads*, e após as etapas iniciais de filtragem, esse número foi reduzido para 230.566.264 *single-end reads* (Tabela 2).

Tabela 2 - Informação sobre os dados iniciais do sequenciamento das bibliotecas. Os dados estão apresentados em relação aos tratamento/tempo, para formação dos bulks.

Bibliotecas	N <sup>o</sup> de <i>reads</i> iniciais	Filtrados (n <sup>o</sup> de <i>reads</i> finais)
Bulk 1 (falso inoculado 3 e 6h)	40.999.415	38.390.073
Bulk 2 (falso inoculado 12 e 24h)	40.962.140	38.583.524
Bulk 3 (falso inoculado 48 e 96h)	33.482.833	31.607.924
Bulk 4 (inoculado 3 e 6h)	49.787.064	47.443.313
Bulk 5 (inoculado 12 e 24h)	44.851.973	42.807.814
Bulk 6 (inoculado 48 e 96h)	33.202.936	31.733.616
Total	243.286.361	230.566.264

A montagem *de novo* do transcriptoma de *Phaseolus lunatus*, a partir do número total de *reads* finais, gerou 123.206 *contigs* (considerando isoformas). O conjunto de *contigs* obtidos apresentaram comprimento médio de 1.133 nucleotídeos (nt), e intervalo entre 201 e 16.435. A análise total das seis bibliotecas resultou na identificação de 53.779 *contigs* que apresentaram sequencias proteicas correspondentes, dos quais, 44.728 (83%) tiveram pelo menos uma categorização GO (Gene Ontology) associadas, de acordo com a anotação automática do *Blast2GO*.

### 6.4.3 - Transcritos diferencialmente expressos em *P. lunatus*

Um total de 616 transcritos foi diferencialmente expresso nas bibliotecas do tratamento inoculado em relação às respectivas bibliotecas falso-inoculadas. As bibliotecas representadas pelos transcritos diferenciais foram referenciadas como BGD - Biblioteca de Genes Diferenciais. Dos 616 transcritos diferenciais, 427 foram induzidos e 235 reprimidos. Desse total, 290 transcritos (47%) não tiveram uma categoria funcional atribuída. Esse número de transcritos diferenciais foi obtido após a filtragem de sequencias que não receberam pelo menos uma anotação gênica de plantas.

Entre três e seis horas após a inoculação (hai), BGD1 apresentou 243 transcritos diferencialmente expressos, sendo 164 induzidos e 79 reprimidos. Entre 12 e 24 hai (BGD2), 198 transcritos diferenciais foram identificados, sendo 133 induzidos e 88 reprimidos. Em BGD3 (48-96 hai) um total de 221 transcritos diferenciais foi representado, dos quais 130 foram induzidos e 68 reprimidos. Quinhentos e setenta e três dos genes diferencialmente expressos foram identificados em somente uma das bibliotecas. No entanto, 40 dos genes foram comuns a duas bibliotecas e três estavam presentes nas três bibliotecas (Figura 6).

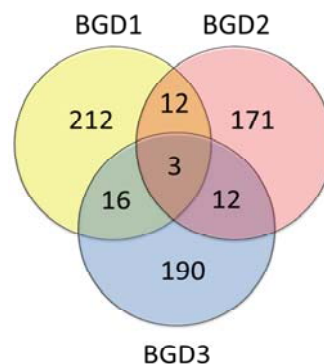


Figura 6 - Diagrama de Venn gerado para as 3 bibliotecas de transcritos diferencialmente expressos. BGD1 corresponde aos transcritos diferencialmente expressos entre o tratamento inoculado e falso-inoculado, entre 3 e 6 horas após a inoculação (hai). BGD2 corresponde aos transcritos diferenciais obtidos entre 24 e 48 hai e BGD3 corresponde aos transcritos diferenciais obtidos entre 48 e 96 hai.

#### 6.4.4 - Anotação dos genes diferenciais

Dos 616 transcritos diferencialmente expressos, 326 receberam pelo menos uma categoria funcional atribuída pelo *Blast2GO* (Tabela 3). BGD1 apresentou 150 transcritos categorizados (TC), dos quais 100 foram induzidos e 50 reprimidos. BGD2 foi representado por 138 TC, sendo 90 induzidos e 48 reprimidos, enquanto que BGD3 apresentou 60 TC, dos quais 44 foram induzidos e 16 reprimidos (figura 7).



Figura 7 - Diagrama de Venn gerado para as 3 bibliotecas de transcritos diferencialmente expressos, contendo apenas transcritos com anotação automática do *Blast2GO*. BGD1 corresponde aos transcritos diferencialmente expressos entre o tratamento inoculado e falso-inoculado, entre 3 e 6 horas após a inoculação (hai). BGD2 corresponde aos transcritos diferenciais obtidos entre 24 e 48 hai e BGD3 corresponde aos transcritos diferenciais obtidos entre 48 e 96 hai.

Tabela 3 - Transcritos diferencialmente expressos em *Phaseolus lunatus* durante infecção com o fungo *Phakopsora pachyrhizi*.

BGD	Cód. da sequência	Anotação gênica	Expressão <i>Fold-Change</i>
1	comp52308_c1_seq3	DNA damage-binding protein 1a-like isoform 1	-3175,00
1	comp48870_c0_seq14	Protein SAMHD1 homolog	-198,50
1	comp38386_c0_seq1	Probable protein phosphatase 2C 60-like	-30,44
1	comp52370_c1_seq18	Superkiller viralicidic activity 2-like 2-like	-28,00
1	comp45935_c0_seq4	Glutathione S-transferase F9	-16,39
1	comp50403_c0_seq1	Chlorophyll a-b binding protein 2, chloroplastic	-15,64
1	comp52488_c0_seq1	14 kda proline-rich protein DC2,15	-12,15
1	comp46206_c0_seq1	Expansin-A8	-10,45
1	comp52044_c0_seq7	Protein RER1A-like	-9,52
1	comp48170_c1_seq1	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	-8,48
1	comp52529_c0_seq1	Chlorophyll a-b binding protein CP24 10B, chloroplastic	-7,99
1	comp44149_c0_seq1	Amino acid permease 2	-7,89
1	comp38599_c0_seq2	Strictosidine synthase-like	-7,83
1	comp37292_c0_seq1	Chlorophyll a-b binding protein 2, chloroplastic	-7,62
1	comp28405_c0_seq1	Chlorophyll a-b binding protein CP24 10A, chloroplastic	-6,66
1	comp46256_c0_seq5	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic-like	-5,86

Continua...

<b>BGD</b>	<b>Cód. da sequência</b>	<b>Anotação gênica</b>	<b>Expressão Fold-Change</b>
1	comp50112_c0_seq1	Chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic	-5,82
1	comp51065_c0_seq30	RING finger protein 141	-5,57
1	comp49623_c0_seq21	Phototropin-1	-5,21
1	comp52403_c0_seq1	Chlorophyll a-b binding protein 215, chloroplastic	-5,11
1	comp43247_c0_seq1	Translation initiation factor eif-2B subunit beta-like	-4,84
1	comp46633_c0_seq7	25.3 kda heat shock protein, chloroplastic-like	-4,54
1	comp51857_c0_seq9	Nucleobase-ascorbate transporter 11-like	-4,49
1	comp50334_c0_seq40	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1-like	-4,00
1	comp52044_c0_seq15	Flowering time control protein FY-like	-4,00
1	comp49672_c1_seq4	Myb-like DNA-binding domain, SHAQKYF class	-3,89
1	comp51300_c0_seq37	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g03230	-3,82
1	comp47247_c0_seq1	Phenylalanyl-trna synthetase, chloroplastic / mitochondrial-like	-3,72
1	comp51493_c0_seq16	Zinc finger protein 4	-3,38
1	comp42265_c0_seq2	Probable pre-mrna-splicing factor ATP-dependent RNA helicase-like isoform 1	-3,35
1	comp49823_c0_seq2	Monocopper oxidase-like protein SKU5-like [Glycine max]	-3,28
1	comp51068_c0_seq17	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3-like	-3,25
1	comp28624_c0_seq2	Linoleate 13S-lipoxygenase 3-1, chloroplastic-like	-3,18
1	comp52145_c0_seq43	NADP-dependent alkenal double bond reductase P1-like	-3,13
1	comp52014_c0_seq4	Starch synthase III	-3,12
1	comp51335_c0_seq27	Cysteine-rich protein precursor	-3,09
1	comp46222_c0_seq1	Pectinesterase 3	-3,06
1	comp43562_c0_seq1	Trihelix transcription factor GT-2-like	-3,01
1	comp49876_c0_seq2	MORC family CW-type zinc finger protein 3	-3,01
1	comp52206_c1_seq23	Uncharacterized protein LOC100808436	-2,91
1	comp47766_c0_seq2	Ribonucleoprotein domain	-2,62
1	comp51300_c0_seq25	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g03230-like	-2,59
1	comp44779_c0_seq4	Beta-hexosaminidase subunit B2-like	-2,58
1	comp47766_c0_seq10	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	-2,21
1	comp52309_c0_seq45	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1-like	-2,18
1	comp51335_c0_seq9	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 17	-2,14
1	comp51655_c0_seq3	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A	2,02
1	comp51908_c0_seq5	Lysine-specific demethylase REF6-like	2,02
1	comp48897_c1_seq15	Protein kinase APK1A, chloroplastic-like	2,04
1	comp51789_c0_seq9	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase-like	2,07
1	comp52302_c0_seq40	Squalene monooxygenase-like	2,08
1	comp51783_c0_seq12	Auxin response factor 6-like	2,24
1	comp52316_c0_seq6	LINE-1 reverse transcriptase homolog	2,36

Continua...

<b>BGD</b>	<b>Cód. da sequência</b>	<b>Anotação gênica</b>	<b>Expressão <i>Fold-Change</i></b>
1	comp47276_c0_seq8	Probable protein phosphatase 2C 6-like	2,43
1	comp51661_c0_seq1	Callose synthase 9-like isoform 1	2,50
1	comp48897_c1_seq21	Protein kinase APK1A, chloroplastic	2,55
1	comp52121_c0_seq3	Myb-like protein L	2,62
1	comp50483_c0_seq22	Type I inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1-like [Glycine max]	2,67
1	comp51493_c0_seq20	Zinc finger protein 4	2,72
1	comp45011_c0_seq10	Probable splicing factor 3A subunit 1-like isoform 1	2,77
1	comp52295_c0_seq1	5-oxoprolinase-like	2,80
1	comp52026_c1_seq9	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase	2,83
1	comp50350_c0_seq2	Ribonuclease G	2,98
1	comp52145_c0_seq41	NADP-dependent alkenal double bond reductase P1-like	2,99
1	comp51539_c0_seq10	Rubisco large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic-like	3,00
1	comp52377_c0_seq3	Callose synthase 7-like	3,06
1	comp50575_c0_seq7	Peroxisome biogenesis protein 6	3,48
1	comp52302_c0_seq32	Squalene monooxygenase-like	3,51
1	comp44390_c0_seq1	CTP synthase	3,71
1	comp52218_c0_seq5	BEL1-like homeodomain protein 10-like	3,71
1	comp50926_c0_seq19	DNA repair protein REV1-like	3,76
1	comp51517_c0_seq5	5'-3' exoribonuclease 3-like	3,77
1	comp52337_c0_seq14	Protein jade-1	3,80
1	comp52302_c0_seq3	Squalene monooxygenase-like	3,81
1	comp48146_c1_seq3	Riboflavin biosynthesis protein ribba, chloroplastic-like	3,89
1	comp28984_c0_seq2	Cleavage stimulation factor subunit 3-like	3,98
1	comp41546_c0_seq1	Histone acetyltransferase HAC1	4,13
1	comp43794_c0_seq2	MHD domain-containing death-inducing protein-like	4,22
1	comp42105_c0_seq3	U-box domain-containing protein 35-like	4,39
1	comp49632_c0_seq10	Probable serine/threonine-protein kinase Cx32, chloroplastic-like	4,46
1	comp51857_c0_seq6	Nucleobase-ascorbate transporter 11-like	4,46
1	comp42506_c0_seq3	Auxin-induced protein 5NG4-like	4,47
1	comp48355_c0_seq1	Protein TWIN LOV 1-like	4,84
1	comp49990_c0_seq1	Unknown [Medicago truncatula]	5,15
1	comp47751_c0_seq3	Histone-lysine N-methyltransferase ASHH3-like	5,31
1	comp49107_c0_seq3	Zinc finger CCCH-type with G patch domain-containing protein	5,35
1	comp41535_c0_seq1	NAC domain-containing protein 78	5,44
1	comp49164_c0_seq3	Embryogenesis-associated protein EMB8-	5,66
1	comp52088_c0_seq13	Beta-glucosidase 24-like [Glycine max]	7,87
1	comp49873_c0_seq10	Type I inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2-like [Glycine max]	8,39
1	comp27693_c0_seq2	Unknown [Glycine max]	8,94

Continua...

<b>BGD</b>	<b>Cód. da sequência</b>	<b>Anotação gênica</b>	<b>Expressão <i>Fold-Change</i></b>
1	comp53805_c0_seq1	Probable CCR4-associated factor 1 homolog 9-like [Glycine max]	9,23
1	comp26682_c0_seq1	Calcium-binding protein PBP1	9,92
1	comp33845_c0_seq1	Probable WRKY transcription factor 33-like	10,06
1	comp52309_c0_seq26	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1-like [Glycine max]	10,15
1	comp37515_c0_seq1	NADPH:isoflavone reductase [Glycine max]	10,84
**1	comp46654_c0_seq1	Intracellular pathogenesis related protein	10,91
1	comp46679_c0_seq1	Phenylalanine ammonia-lyase class 3	11,31
**1	comp36757_c0_seq1	2-hydroxyisoflavanone synthase	11,35
1	comp38540_c0_seq1	Zinc finger protein ZAT10-like [Glycine max]max]	11,46
1	comp40496_c0_seq4	Probable WRKY transcription factor 40-like [Glycine max]	11,98
1	comp29961_c0_seq2	Regulator of ribonuclease-like protein 3	12,05
1	comp52044_c0_seq3	Protein RER1A-like [Glycine max]	12,12
1	comp49160_c0_seq2	Myb-related protein Myb4-like [Glycine max]	12,53
1	comp33845_c0_seq2	Probable WRKY transcription factor 33-like [Glycine max]	12,79
1	comp51175_c0_seq16	Calcium-dependent protein kinase 28	13,12
1	comp51600_c0_seq4	Phenylalanine ammonia-lyase 1	13,42
**1	comp52154_c0_seq1	Chalcone synthase 17	14,75
1	comp53511_c0_seq1	Phaseolin G-box binding protein PG2	14,95
1	comp53314_c0_seq1	Probable calcium-binding protein CML45-like [Glycine max]	16,95
1	comp54521_c0_seq1	E3 ubiquitin-protein ligase RING1-like [Glycine max]	17,15
1	comp52154_c0_seq2	Chalcone synthase 17	17,16
1	comp51442_c0_seq38	E3 ubiquitin-protein ligase RGLG2-like [Glycine max]	17,65
1	comp41780_c0_seq2	Ligand-binding betv1 domain	17,93
1	comp51600_c0_seq2	Phenylalanine ammonia-lyase 1	18,00
1	comp21070_c0_seq1	Mitogen-activated protein kinase 3-like [Glycine max]	18,10
1	comp37865_c0_seq1	BTB/POZ domain-containing protein At5g41330-like [Glycine max]	18,22
1	comp43743_c0_seq1	Cyclic nucleotide-gated ion channel 1-like [Glycine max]	18,36
1	comp26238_c0_seq1	Probable mitochondrial chaperone BCS1-B-like [Glycine max]	19,56
1	comp29549_c0_seq1	E3 ubiquitin-protein ligase ATL6-like [Glycine max]	20,26
1	comp49160_c0_seq3	Myb-related protein Myb4-like [Glycine max]	20,62
1	comp30682_c0_seq1	Laccase-9-like [Glycine max]	20,81
1	comp55450_c0_seq1	Probable mannitol dehydrogenase-like [Glycine max]	20,89
1	comp42481_c0_seq2	Transcription factor [Glycine max]	21,19
1	comp24065_c0_seq2	Uncharacterized protein LOC100500350 [Glycine max]	22,16
1	comp45023_c0_seq1	2-hydroxyisoflavanone dehydratase	22,27
1	comp38290_c0_seq4	Uncharacterized hydrolase C22A12.06c-like isoform 1 [Glycine max]	22,63
1	comp48897_c1_seq22	Protein kinase 1b [Glycine max]	30,38
1	comp52308_c1_seq2	DNA damage-binding protein 1a-like isoform 1 [Glycine max]	30,67

Continua...

BGD	Cód. da sequência	Anotação gênica	Expressão <i>Fold-Change</i>
1	comp38306_c0_seq1	Probable caffeoyl-coa O-methyltransferase	31,02
1	comp27693_c0_seq1	Indole-3-acetic acid induced protein ARG-2 homolog	31,80
1	comp40496_c0_seq3	Probable WRKY transcription factor 40-like [Glycine max]	33,10
1	comp29587_c0_seq1	Lipid transfer-like protein VAS-like [Glycine max]	34,74
1	comp37220_c0_seq3	Probable protein phosphatase 2C 25-like [Glycine max]	35,65
1	comp54027_c0_seq1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	37,44
1	comp42663_c0_seq1	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim22-like [Glycine max]	44,61
1	comp29298_c0_seq1	Putative NAC domain-containing protein 94	46,29
1	comp46502_c0_seq9	LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic-like [Glycine max]	53,19
1	comp48897_c1_seq19	Protein kinase 1b [Glycine max]	53,86
1	comp38585_c0_seq3	Probable tyrosine-protein phosphatase At1g05000	58,00
1	comp48897_c1_seq18	Protein kinase 1b [Glycine max]	59,80
1	comp49717_c0_seq1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	82,07
1	comp38290_c0_seq3	Serine hydrolase (FSH1)	85,82
1	comp48897_c1_seq10	Protein kinase 1b [Glycine max]	117,00
1	comp40910_c0_seq2	Protein SRG1	131,18
1	comp43830_c0_seq2	Prostaglandin G/H synthase 2-like [Glycine max]	145,83
1	comp36727_c0_seq1	Protein kinase 2A, chloroplastic-like [Glycine max]	160,00
1	comp49160_c0_seq4	Myb-related protein Myb4-like [Glycine max]	198,33
1	comp34821_c0_seq2	Transcription factor [Glycine max]	252,00
1	comp47868_c0_seq3	Phosphoinositide binding Phox Homology domain	388,00
2	comp51811_c0_seq58	Insulin-degrading enzyme-like [Glycine max]	-344,00
2	comp51414_c0_seq1	Uncharacterized protein LOC100803519 [Glycine max]	-46,06
2	comp49579_c0_seq4	2,3-dimethylmalate lyase-like [Glycine max]	-39,73
2	comp49683_c0_seq6	(-)-germacrene D synthase-like [Glycine max]	-15,54
2	comp51476_c0_seq10	Transcription initiation factor TFIID subunit 2-like [Glycine max]	-14,90
2	comp49326_c0_seq2	Glutamate receptor 3.4-like [Glycine max]	-12,81
2	comp51493_c0_seq27	Zinc finger protein 4	-10,55
2	comp51647_c0_seq10	Myosin ID heavy chain-like [Glycine max]	-8,73
2	comp50492_c0_seq2	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase-like [Glycine max]	-6,56
2	comp42506_c0_seq1	Auxin-induced protein 5NG4	-6,35
2	comp37253_c0_seq5	E3 ubiquitin-protein ligase MARCH2	-5,90
2	comp43950_c0_seq1	BAG family molecular chaperone regulator 1	-5,88
2	comp49346_c0_seq3	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 1-like [Glycine max]	-5,84
2	comp36904_c0_seq4	Cyclin-U1-1	-5,71
2	comp46585_c0_seq10	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase 1-like [Glycine max]	-5,50
2	comp50631_c0_seq11	Albumin-2 [Phaseolus vulgaris]	-5,40

Continua...

<b>BGD</b>	<b>Cód. da sequência</b>	<b>Anotação gênica</b>	<b>Expressão Fold-Change</b>
2	comp49623_c0_seq2	Phototropin-1	-5,31
2	comp48037_c1_seq3	Putative phosphoglycerate mutase DET1-like [Glycine max]	-5,10
2	comp44941_c0_seq2	RING-finger domain	-4,65
2	comp45271_c0_seq1	Trna-dihydrouridine synthase 2-like isoform 1 [Glycine max]	-4,59
2	comp49164_c0_seq3	Embryogenesis-associated protein EMB8-like [Glycine max]	-4,55
2	comp52370_c1_seq91	Superkiller viralicidic activity 2-like 2-like [Glycine max]	-4,37
2	comp50833_c1_seq24	Uncharacterized protein LOC100811760 [Glycine max]	-3,86
2	comp43095_c0_seq1	Probable mannitol dehydrogenase	-3,71
2	comp50828_c0_seq32	Uridine-cytidine kinase C-like [Glycine max]	-3,68
2	comp28572_c0_seq1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 41-like [Glycine max]	-3,57
2	comp47521_c0_seq4	Lariat debranching enzyme	-3,47
2	comp52057_c0_seq1	ABC transporter I family member 19-like [Glycine max]	-3,45
2	comp42559_c0_seq5	Polypyrimidine tract-binding protein homolog 2-like [Glycine max]	-3,42
2	comp49357_c0_seq2	Probable serine/threonine-protein kinase mps1	-3,33
2	comp50790_c0_seq4	Triacylglycerol lipase	-3,30
2	comp51760_c3_seq23	UDP-glycosyltransferase 74F1-like [Glycine max]	-3,19
2	comp35225_c0_seq2	Two-component response regulator-like PRR95-like isoform 1 [Glycine max]	-3,16
2	comp47954_c0_seq13	ATP-dependent RNA helicase SUPV3L1, mitochondrial-like [Glycine max]	-3,08
2	comp45212_c0_seq1	Vacuolar-processing enzyme [Phaseolus vulgaris]	-3,04
2	comp52121_c0_seq1	Myb-like protein L	-3,01
2	comp41130_c0_seq2	Rubisco large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic-like [Glycine max]	-2,90
2	comp50558_c0_seq10	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18-like [Glycine max]	-2,80
2	comp51178_c0_seq5	Zinc finger CCCH domain-containing protein 6-like [Glycine max]	-2,72
2	comp47276_c0_seq21	Probable protein phosphatase 2C 6-like [Glycine max]	-2,62
2	comp50558_c0_seq14	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18-like [Glycine max]	-2,58
2	comp48656_c0_seq5	Metal tolerance protein C1-like [Glycine max]	-2,53
2	comp46195_c0_seq2	BEL1-like homeodomain protein 2-like [Glycine max]	-2,43
2	comp46891_c0_seq2	Beclin 1 protein [Glycine max]	-2,40
2	comp49136_c0_seq3	Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog [Glycine max]	-2,27
2	comp44290_c0_seq2	Cyclin-D1-1-like [Glycine max]	-2,25
2	comp44358_c0_seq2	Probable inactive purple acid phosphatase 1-like [Glycine max]	-2,19
2	comp48677_c0_seq3	Transcription factor bhlh140-like [Glycine max]	-2,06
2	comp50334_c0_seq26	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1-like [Glycine max]	2,07

Continua...

<b>BGD</b>	<b>Cód. da sequência</b>	<b>Anotação gênica</b>	<b>Expressão Fold-Change</b>
2	comp52107_c1_seq5	Molybdenum cofactor sulfurase-like [Glycine max]	2,09
2	comp47182_c0_seq1	Probable serine/threonine-protein kinase At5g41260-like [Glycine max]	2,17
2	comp51718_c0_seq16	Putative leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At2g19210	2,21
2	comp49372_c0_seq1	Probable inactive receptor kinase At5g67200-like	2,22
2	comp37694_c0_seq1	Pathogenesis-related protein 1	2,25
2	comp49669_c0_seq3	Phospholipase D p1-like [Glycine max]	2,27
2	comp27771_c0_seq1	Vacuolar cation/proton exchanger 3	2,32
2	comp44400_c0_seq2	Cell cycle checkpoint protein RAD17-like [Glycine max]	2,42
2	comp52169_c0_seq8	Protein flug-like [Glycine max]	2,51
2	comp28984_c0_seq2	Cleavage stimulation factor subunit 3-like [Glycine max]	2,64
2	comp46891_c0_seq8	Beclin 1 protein [Glycine max]	2,65
2	comp46222_c0_seq1	Pectinesterase 3	2,67
2	comp50072_c0_seq21	Putative membrane-bound O-acyltransferase C24H6.01c-like [Glycine max]	2,75
2	comp44590_c0_seq2	Ferritin-3, chloroplastic	2,79
2	comp51631_c0_seq34	Alpha-glucosidase yihq-like [Glycine max]	2,84
2	comp46428_c0_seq1	Probable phosphoglycerate mutase gpmb	2,85
2	comp52318_c0_seq28	GDP-mannose-dependent alpha-mannosyltransferase	2,86
2	comp50818_c0_seq1	Probable polygalacturonase-like [Glycine max]	2,97
2	comp44477_c0_seq4	Transcriptional adapter ADA2-like [Glycine max]	2,98
2	comp46679_c0_seq1	Phenylalanine ammonia-lyase class 3	3,01
2	comp38314_c0_seq2	Yippee putative zinc-binding protein	3,03
**2	comp36757_c0_seq1	2-hydroxyisoflavanone synthase	3,04
2	comp51442_c0_seq10	E3 ubiquitin-protein ligase RGLG2-like [Glycine max]	3,07
2	comp43534_c0_seq3	Casein kinase I isoform delta-like [Glycine max]	3,11
2	comp49363_c0_seq3	Protein TRANSPARENT TESTA 12-like [Glycine max]	3,20
2	comp45674_c0_seq4	Protein DA1-like isoform 1 [Glycine max]	3,21
2	comp22546_c0_seq1	Isoflavone 2'-hydroxylase-like [Glycine max]	3,29
2	comp49127_c0_seq2	Protein RFT1 homolog [Glycine max]	3,31
2	comp20897_c0_seq1	Chlorophyll a-b binding protein 1D (Fragment)	3,32
2	comp48453_c0_seq1	Plastidic glucose transporter 4-like [Glycine max]	3,40
2	comp51600_c0_seq2	Phenylalanine ammonia-lyase 1	3,43
2	comp51836_c0_seq2	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	3,58
2	comp41924_c0_seq1	ABC transporter G family member 36-like [Glycine max]	3,59
2	comp51306_c1_seq9	Glutamyl-trna(Gln) amidotransferase subunit A-like [Glycine max]	3,62
2	comp24115_c0_seq1	Serine/threonine-protein kinase CTR1-like [Glycine max]	3,63
2	comp29809_c0_seq1	Peroxidase 22	3,65
**2	comp52154_c0_seq1	Chalcone synthase 17	3,77
2	comp51931_c1_seq23	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3 [Glycine max]	3,81

Continua...

<b>BGD</b>	<b>Cód. da sequência</b>	<b>Anotação gênica</b>	<b>Expressão Fold-Change</b>
2	comp48729_c0_seq6	Uncharacterized protein LOC100786943 [Glycine max]	3,82
2	comp24177_c0_seq1	Endo-1,3(4)-beta-glucanase 1	3,84
2	comp51061_c0_seq1	Chalcone reductase [Glycine max]	3,85
2	comp25191_c0_seq1	Probable protein phosphatase 2C 40	3,89
2	comp46806_c0_seq4	Casein kinase I isoform delta-like isoform 1 [Glycine max]	3,92
2	comp46688_c0_seq3	Probable zinc protease pqq1-like [Glycine max]	4,00
**2	comp46654_c0_seq1	Intracellular pathogenesis related protein	4,00
2	comp48215_c0_seq5	Probable protein phosphatase 2C 52-like [Glycine max]	4,01
2	comp48210_c0_seq12	Uncharacterized protein LOC100805878 [Glycine max]	4,12
2	comp51442_c0_seq4	E3 ubiquitin-protein ligase RGLG2-like [Glycine max]	4,18
2	comp44941_c0_seq6	RING-finger domain	4,18
2	comp44736_c0_seq1	Probable iron/ascorbate oxidoreductase DDB_G0283291-like [Glycine max]	4,27
2	comp17235_c0_seq1	Probable glutathione S-transferase [Glycine max]	4,47
2	comp45652_c0_seq4	Uncharacterized protein LOC100790239 [Glycine max]	4,50
2	comp45337_c0_seq2	Inorganic pyrophosphatase 2	4,57
2	comp42122_c0_seq3	Bark storage protein A-like [Glycine max]	4,70
2	comp41481_c0_seq3	MYB transcription factor MYB75 [Glycine max]	4,76
2	comp52363_c0_seq22	Probable phenylalanyl-trna synthetase beta chain-like [Glycine max]	4,98
2	comp52057_c0_seq35	ABC transporter I family member 19-like [Glycine max]	5,35
2	comp44590_c0_seq1	Ferritin, chloroplastic	5,42
2	comp46160_c0_seq6	Chaperone protein dnaJ 6-like [Glycine max]	5,48
2	comp51761_c0_seq1	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 4	5,49
2	comp41623_c0_seq2	Membrane transport protein	5,51
2	comp50631_c0_seq12	Albumin-2 [Phaseolus vulgaris]	5,56
2	comp52102_c0_seq14	Wall-associated kinase [Glycine max]	6,06
2	comp20504_c0_seq2	Probable glutathione S-transferase [Glycine max]	6,13
2	comp29854_c0_seq2	L-allo-threonine aldolase-like	6,38
2	comp42536_c0_seq3	Malate dehydrogenase, glyoxysomal	6,53
2	comp41590_c0_seq2	Serine carboxypeptidase-like 45-like [Glycine max]	7,30
2	comp50980_c1_seq3	Anthranilate phosphoribosyltransferase-like [Glycine max]	7,65
2	comp41810_c0_seq1	Non-specific lipid-transfer protein-like [Glycine max]	7,91
2	comp52488_c0_seq1	14 kda proline-rich protein DC2,15	8,30
2	comp26221_c0_seq2	Adenylyltransferase and sulfurtransferase MOCS3-like [Glycine max]	8,32
2	comp52218_c0_seq7	BEL1-like homeodomain protein 10-like [Glycine max]	8,83
2	comp36510_c0_seq1	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class U protein-like [Glycine max]	8,97
2	comp52356_c0_seq3	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 25-like	9,08
2	comp53309_c0_seq1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 3	9,89
2	comp52384_c0_seq11	Probable receptor-like protein kinase At1g67000-like [Glycine max]	9,96

Continua...

<b>BGD</b>	<b>Cód. da sequência</b>	<b>Anotação gênica</b>	<b>Expressão Fold-Change</b>
2	comp42349_c0_seq1	Momilactone A synthase-like [Glycine max]	10,58
2	comp38769_c0_seq3	Uncharacterized RNA pseudouridine synthase aq_1464-like [Glycine max]	10,86
2	comp51857_c0_seq3	Nucleobase-ascorbate transporter 11-like [Glycine max]	10,94
2	comp49326_c0_seq3	Glutamate receptor 3.4-like [Glycine max]	12,42
2	comp49343_c0_seq2	Acid beta-fructofuranosidase	15,83
2	comp52370_c1_seq38	Superkiller viralicidic activity 2-like 2-like [Glycine max]	16,23
2	comp25689_c0_seq1	Stem 28 kda glycoprotein	16,36
2	comp45842_c0_seq4	14-3-3-like protein-like [Glycine max]	19,28
2	comp52309_c0_seq7	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1-like [Glycine max]	31,72
2	comp47276_c0_seq26	Probable protein phosphatase 2C 6-like [Glycine max]	48,00
2	comp48036_c1_seq2	Probable serine/threonine-protein kinase DDB_G0279405-like [Glycine max]	52,28
2	comp43764_c0_seq3	Putative E3 ubiquitin-protein ligase RF298-like [Glycine max]	53,08
2	comp41495_c0_seq1	GT1 family of glycosyltransferases	317,00
3	comp51299_c0_seq16	Protein methyltransferase hemk homolog [Glycine max]	-211,00
3	comp46175_c0_seq5	Plastidial lipoyltransferase 2-like [Glycine max]	-27,21
3	comp28660_c0_seq4	Eukaryotic translation initiation factor 5A	-15,05
3	comp46817_c0_seq4	Choline-phosphate cytidylyltransferase B-like protein [Phaseolus vulgaris]	-14,03
3	comp37481_c0_seq4	Glycosyl hydrolase family 31 (GH31)	-9,93
3	comp52014_c0_seq4	Soluble starch synthase 3, chloroplastic/amyloplastic	-7,26
3	comp38053_c0_seq1	Uncharacterized protein LOC100805861 [Glycine max]	-5,95
3	comp49099_c0_seq19	Putative lipid phosphate phosphatase 3, chloroplastic	-5,68
3	comp51065_c0_seq25	RING finger protein 141	-4,71
3	comp47751_c0_seq1	Histone-lysine N-methyltransferase ASHH3-like [Glycine max]	-4,27
3	comp43095_c0_seq1	Probable mannitol dehydrogenase	-3,75
3	comp37359_c0_seq8	46 kda membrane protein	-2,91
3	comp42190_c0_seq2	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	-2,66
3	comp38834_c0_seq2	Putative glycerol-3-phosphate transporter 5-like [Glycine max]	-2,65
3	comp51539_c0_seq4	Chaperonin 60 subunit beta 4, chloroplastic	-2,48
3	comp51493_c0_seq10	Zinc finger protein 4	-2,06
3	comp52632_c0_seq1	Beta-glucosidase 44-like [Glycine max]	2,17
3	comp24060_c0_seq1	Cysteine synthase [Glycine max]	2,29
3	comp51186_c0_seq4	Putative vacuolar protein sorting-associated protein 13A	2,48
3	comp38361_c0_seq1	Subtilisin-like protease C1 precursor [Glycine max]	2,48
3	comp44830_c0_seq1	Repressor of RNA polymerase III transcription MAF1 homolog isoform 1	2,69
3	comp50720_c0_seq2	Exosome component 10-like [Glycine max]	2,85
3	comp45551_c0_seq4	Desiccation-related protein At2g46140-like [Glycine max]	3,00
3	comp46633_c0_seq6	25,3 kda heat shock protein, chloroplastic	3,20

Continua...

BGD	Cód. da sequência	Anotação gênica	Expressão <i>Fold-Change</i>
3	comp29179_c0_seq1	Probable purine permease 9-like [Glycine max]	3,30
3	comp52380_c0_seq11	Protein SUPPRESSOR OF npr1-1, CONSTITUTIVE 1	3,59
3	comp52315_c0_seq2	Receptor-like protein kinase FERONIA-like [Glycine max]	3,62
3	comp47751_c0_seq3	Histone-lysine N-methyltransferase ASHH3-like [Glycine max]	3,66
3	comp48716_c0_seq10	Transcription factor BIM3-like [Glycine max]	3,78
3	comp46698_c0_seq3	G-box-binding factor 1	3,82
3	comp49672_c1_seq7	Two-component response regulator ARR18	4,24
3	comp39866_c0_seq1	Ras-related protein RABA5a-like [Glycine max]	4,28
3	comp42100_c0_seq2	Probable 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase-like [Glycine max]	4,40
3	comp21586_c0_seq2	Isoflavone 7-O-methyltransferase-like	4,54
3	comp47382_c0_seq4	Adenylyl-sulfate kinase, chloroplastic-like [Glycine max]	4,64
**3	comp36757_c0_seq1	2-hydroxyisoflavanone synthase	4,66
3	comp46206_c0_seq1	Expansin-A8	4,82
3	comp28077_c0_seq1	Defensin D1 [Phaseolus vulgaris]	4,94
3	comp44573_c0_seq2	Uncharacterized protein LOC100804099 [Glycine max]	5,32
3	comp20939_c0_seq1	Endochitinase CH5B	5,59
**3	comp52154_c0_seq1	Chalcone synthase 17	5,94
3	comp51976_c0_seq12	Ribosomal protein s7	6,35
3	comp49904_c0_seq2	Carboxypeptidase B2-like [Glycine max]	6,42
3	comp45823_c0_seq7	Uncharacterized protein LOC100785365 [Glycine max]	7,56
3	comp42122_c0_seq3	Bark storage protein A-like [Glycine max]	7,64
3	comp37694_c0_seq1	Pathogenesis-related protein 1	7,84
3	comp52593_c0_seq1	Wound-induced protein WIN2	7,91
3	comp51061_c0_seq1	Chalcone reductase [Glycine max]	8,43
3	comp55072_c0_seq1	Beta-1,3-glucanase [Sesbania rostrata]	9,24
3	comp53314_c0_seq1	Probable calcium-binding protein CML45-like [Glycine max]	11,46
3	comp52422_c0_seq1	Pathogenesis-related protein 1	12,57
3	comp46458_c0_seq1	Acidic endochitinase-like [Glycine max]	13,36
3	comp51239_c0_seq2	Katanin p60 atpase-containing subunit	14,67
**3	comp46654_c0_seq1	Intracellular pathogenesis related protein	15,98
3	comp41810_c0_seq1	Non-specific lipid-transfer protein-like [Glycine max]	17,62
3	comp50911_c0_seq1	Glucosyltransferase-3 [Vigna angularis]	19,10
3	comp52443_c0_seq1	1,3-beta-D-glucanase [Phaseolus vulgaris]	19,17
3	comp46274_c0_seq3	Helicase SKI2W-like [Glycine max]	19,79
3	comp51539_c0_seq10	Rubisco large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic-like [Glycine max]	33,09
3	comp52107_c1_seq7	Molybdenum cofactor sulfurase-like [Glycine max]	307,00

BGD: Biblioteca de Genes Diferenciais; BGD1: 3 e 6 horas após infecção (hai); BGD2: 12 e 24 hai; BGD3: 48 e 96 hai.

\*\* Transcritos comuns às três BGDs.

Três transcritos foram comuns às três BGDs e apresentaram similaridades com sequências codificadoras para chalcona sintase, 2-hidroxi-isoflavona sintase e uma proteína relacionada à patogenicidade (Figura 8).

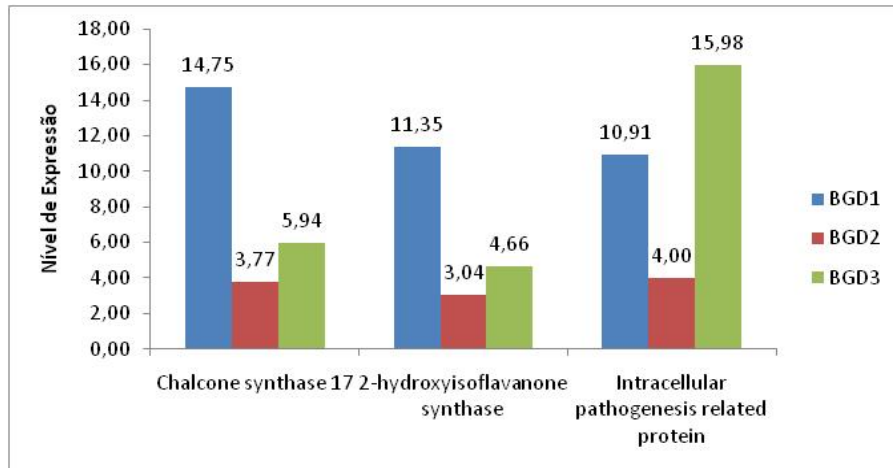


Figura 8 - Perfil de expressão gênica dos três transcritos comuns às três bibliotecas de genes diferenciais de folhas *Phaseolus lunatus* infectadas com *Phakopsora pachyrhizi*. BGD1: Biblioteca de Genes Diferenciais obtidos entre 3 e 6 horas após a inoculação. BGD2: Biblioteca de Genes Diferenciais obtidos entre 12 e 24 horas após a inoculação. BGD3: Biblioteca de Genes Diferenciais obtidos entre 48 e 96 horas após a inoculação.

#### 6.4.5 - Transcritos anotados em processos biológicos

Um total de 235 transcritos foi agrupado em 13 categorias de processos biológicos, segundo anotação automática do *Blast2GO* (Figura 9). Desse total, 165 transcritos foram induzidos e 70 reprimidos. Noventa e oito transcritos foram anotados em BGD1 (67% induzidos e 33% reprimidos), 98 anotados em BGD2 (69% induzidos e 39% reprimidos) e 39 anotados em BGD3 (72% induzidos e 28% reprimidos).

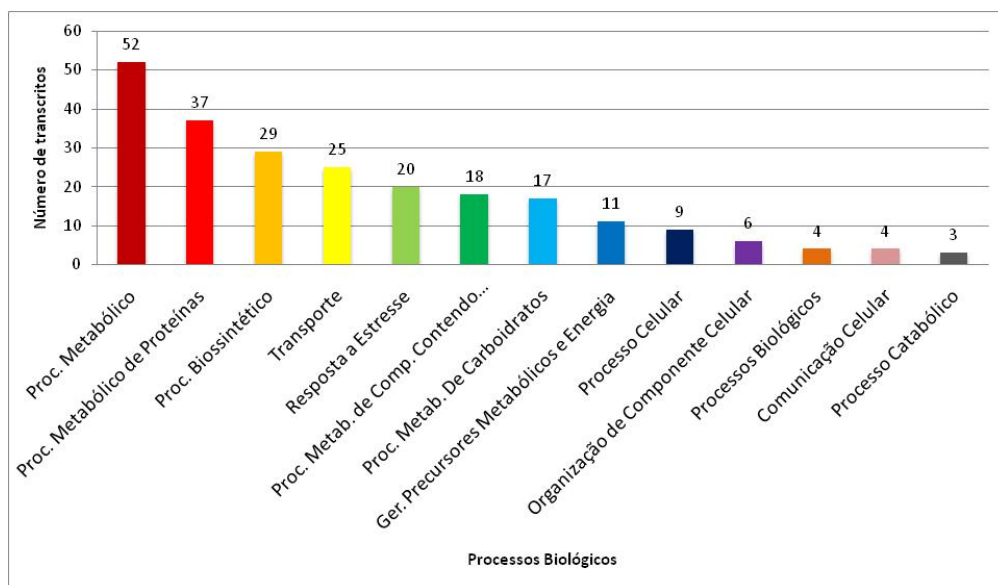


Figura 9 - Categorização dos transcritos induzidos de *P. lunatus* infectada com *P. pachyrhizi*, relacionados a processos biológicos, atribuído automaticamente pelo *Blast2GO*.

### ***Processos metabólicos***

Entre os representantes de processos metabólicos, aproximadamente 59% foram induzidos em cada uma das BGDs e incluem exemplos de transcritos como 2-hidroxi-isoflavonona sintase, 2-hidroxi-isoflavonona redutase, chalcona redutase, antocianidina –o-glucosiltransferase, entre outros. Entre os transcritos reprimidos encontram-se zeaxantina epoxidase, 2,3-dimetilmalato liase, lipotransferase entre outros. 2-hidroxi-isoflavonona sintase foi comum e induzida nas três BGDs.

### ***Processos Metabólicos de proteínas***

Transcritos incluídos nessa categoria são representados por metabolismo proteico, tradução e processos de modificação de proteína celular. Em BGD1 81% dos transcritos foram induzidos, seguidos de 78% em BGD2 e apenas um transcrito em BGD3. Em BGD1 e BGD2, a maioria dos transcritos induzidos foi representada por quinases. BGD3 foi representada pela indução de uma carboxipeptidase e a repressão de metiltransferase e um fator de iniciação da tradução.

### ***Processos Biossintéticos***

Entre os transcritos representados nessa categoria, 75% foram induzidos em BGD1, seguidos de 86% em BGD2 e 70% em BGD3. Entre os transcritos induzidos encontram-se genes anotados para fenilalanina amônia liase (classe I e III) chalcona sintase, proteína com domínio LBS-LRR, entre outros. Entre os transcritos reprimidos, aparecem estrictosidina sintase, UDP-glucose glucosiltransferase, entre outros.

### ***Transporte***

Seis transcritos foram representados em BGD1, sendo 4 induzidos e 2 reprimidos. Em BGD2, 15 transcritos foram relacionados a esse processo, onde 63% foram induzidos. BGD3 foi representado por quatro transcritos, sendo dois induzidos. Exemplos dessa categoria incluem transportes de lipídeo, canais de cálcio e hidrogênio, entre outros.

### ***Resposta a estresse***

Essa categoria foi representada por 10 transcritos em BGD1, sendo 7 induzidos. Em BGD2 e BGD3, todos os transcritos associados a resposta a estresse foram induzidos. Duas proteínas relacionadas à patogenicidade (PR) foram induzidas. Uma

delas, classificada como uma PR intracelular foi induzida em todas as três BGDs. A outra PR, denominada PR-1, foi induzida em BGD2 e BGD3, não sendo representada em BGD1. Pectinesterase, isoflavona 2-hidrolase, peroxidase e defensina foram alguns exemplos de proteínas relacionadas a estresse, induzidas em folhas de *P. lunatus*.

### ***Processos metabólicos de componentes contendo nucleobase***

Nessa categoria também foram incluídos transcritos relacionados ao processo metabólico do DNA. Sete transcritos foram representados em BGD1, sendo um reprimido (fenilalanil-tRNA). Em BGD2, seis transcritos foram induzidos, incluindo dois membros ABC transporte e uma fenilalanil-tRNA, e quatro transcritos reprimidos. BGD3 foi representada apenas por um transcrito induzido (5 - metiltioadenosina s-adenosilhomocisteína nucleosidase).

### ***Processo metabólico de carboidratos***

Cinco transcritos foram representados em BGD1, sendo três induzidos. Em BGD2 e BGD3, seis transcritos foram agrupados nessa categoria, sendo apenas um reprimido em BGD3. Genes anotados para Endo 1-4 beta xilanase, beta glucosidade, glicohidrolase entre outros, estiveram presentes entre os transcritos induzidos. Em BGD3 duas quitinases e duas glucanases estiveram entre os transcritos induzidos.

### ***Geradores de precursores metabólicos e energia***

Em BGD1 100% dos transcritos foram reprimidos e incluem proteínas de ligação à clorofila a/b. Em BGD2, três transcritos foram induzidos, sendo representados por uma proteína de ligação à clorofila a/b, uma subunidade 1 glucose-1-fosfato adeniltransferase e uma subunidade 4 NADH-plastoquinona oxidoreductase. Em BGD3 não foram encontrados transcritos anotados nessa categoria.

### ***Processo celular***

Essa categoria foi representada por transcritos anotados em processo celular e homeostase. Em BGD1, cinco transcritos foram representados, sendo quatro induzidos. Entre esses, duas quinases e uma fosfatase estavam presentes. Em BGD2, quatro transcritos foram relacionados a processo celular, sendo três induzido (proteína de ligação a beta-glucan e duas ferretina cloroplástica). O transcrito reprimido estava

relacionado a uma proteína de biogênese ribossômica. Em BGD3 não foram encontrados transcritos anotados nessa categoria.

### ***Organização do Componente Celular***

Um total de seis transcritos representou esse processo biológico. Em BGD1, dois foram induzidos e dois reprimidos. Uma proteína de controle do tempo de florescimento e uma expansina 2 foram reprimidas, enquanto que uma metiltransferase e uma proteína contendo domínio BTB POZ foram induzidas. Em BGD2 apenas um transcrito anotado para uma pirofosfatase foi induzido. Em BGD3 uma expansina 2 foi induzida.

### ***Processos Biológicos***

Todos os quatro transcritos agrupados nessa categoria foram induzidos, sendo um em BGD1, um transcrito em BGD2 e dois transcritos em BGD3. Proteína de reparo do DNA, proteína vacuolar e protease foram exemplos de transcritos dessa categoria.

### ***Comunicação Celular***

Componentes de comunicação celular e transdução de sinais representaram essa categoria. Quatro transcritos foram anotados, sendo três induzidos em BGD1, representados por uma proteína com domínio Phox, de ligação lipídeo-proteína e proteína-proteína, uma quinase mitógeno-induzida e uma proteína fotorreceptora. Em BGD2 um componente regulador de resposta PRR95 foi reprimido e em BGD3 não foram anotados transcritos nessa categoria.

### ***Processo Catabólico***

Nessa categoria, três transcritos foram anotados, sendo dois induzidos em BGD1 (uma oxoprolinase e uma lacase). Em BGD2, uma proteína não caracterizada foi agrupada nessa categoria, sendo reprimida. Em BGD3 não foram observados transcritos relacionados a esse processo biológico.

A figura 10 sumariza o perfil transcricional dos processos biológicos entre as BGDs.

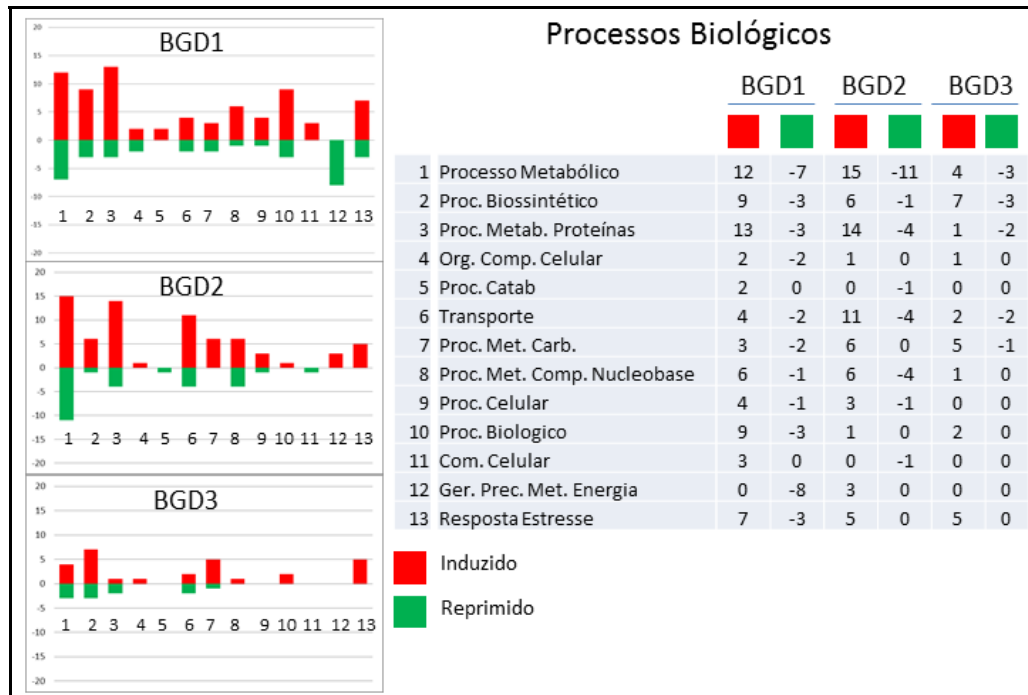


Figura 10 - Distribuição dos transcritos induzidos e reprimidos de cada Biblioteca de Genes Diferenciais (BGD), agrupados em processos biológicos. BGD1: Biblioteca de Genes Diferenciais obtidos entre 3 e 6 horas após a inoculação. BGD2: Biblioteca de Genes Diferenciais obtidos entre 12 e 24 horas após a inoculação. BGD3: Biblioteca de Genes Diferenciais obtidos entre 48 e 96 horas após a inoculação.

#### 6.4.6 - Transcritos anotados em funções moleculares

Um total de 291 transcritos foi anotado em categorias de funções moleculares. A maioria (45%) estava relacionada a funções de ligação, que incluíram transcritos agrupados em ligação a nucleotídeos, a ácidos nucléicos e proteínas. Atividades de hidrolase, catalíticas e transferase também foram super-representadas (Figura 11).

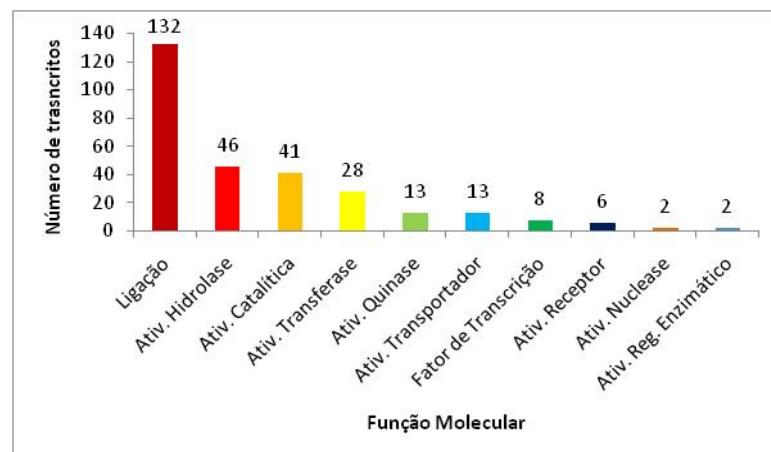


Figura 11 - Categorização função dos transcritos induzidos de *P. lunatus* infectada com *P. pachyrhizi*, relacionados a funções moleculares, atribuído automaticamente pelo *Blast2GO*.

Cento e vinte transcritos foram agrupados em BGD1, 121 em BGD2 e 50 em BGD3. Em BGD1, 88% dos transcritos foram induzidos e 32% reprimidos. Em BGD2, 64% dos transcritos foram induzidos e 36% reprimidos, seguidos de 70% de transcritos induzidos e 30% reprimidos em BGD3.

### ***Ligação***

BGD1 apresentou o maior número de transcritos anotados nessa categoria, com 60 representantes em BGD1 seguidos de 53 transcritos em BGD2 e 19 em BGD3. Entre 3-6 hai (BGD1) 75% dos transcritos relacionados à função molecular de ligação foram induzidos e 25% reprimidos. Em BGD2 (12-24 hai) 60% dos transcritos de ligação foram induzidos e 40% reprimidos e em BGD3 (48-96 hai) dos 18 transcritos anotados nessa categoria, 63% foram induzidos. Entre os transcritos induzidos, encontram-se proteína com domínio Phox de ligação a lipídeos e proteínas, proteínas WRKY, MYB, quinase codificando proteína de resistência, proteína de resistência NBS-LRR entre outras. Transcritos reprimidos são representados por proteína de ligação a danos no DNA, fator de início da transcrição TFIID, metiltransferase, entre outras.

### ***Atividade de hidrolase***

Entre 3-6 hai, 80% dos transcritos foram induzidos e 20% reprimidos. Em BGD2 (12-24 hai) 63% foram induzidos e 37% reprimidos. Em BGD3, entre os 12 transcritos anotados nessa categoria, 83% foram induzidos. Proteínas fosfatase 2c, beta-glucosidade, proteínas ABC transporte, endoquitinases e 2-hidroxi-isoflavonona desitratase foram alguns exemplos de hidrolases induzidas. Pectinesterase 3, proteína reguladora de ribonuclease, Poli(ADP) glicohidrolase entre outras foram exemplos de transcritos reprimidos nessa categoria.

### ***Atividade catalítica***

A maioria dos transcritos relacionados com atividade catalítica foi induzida. Em BGD1, dos 17 transcritos identificados, 76% foram induzidos. Em BGD2, dos 21 representantes, 76% foi induzida enquanto que em BGD3, apenas três transcritos foram relacionados nessa categoria, sendo todos induzidos. Entre os transcritos induzidos foram observados proteína siringolide induzida (SRG1), fenilalanina amônia liase (classe I e III), esqualeno epoxidase e monooxigenase, chalcona redutase entre outras.

Entre os transcritos reprimidos, foi observado, strictosidina sintase, zeaxantina epoxidase, dimetilmalato liase entre outras.

### ***Atividade de transferase***

Em BGD1, 50% dos transcritos foram induzidos. Em BGD2, 75% foram induzidos, seguidos de 60% em BGD3. Chalcona sintase, isoflavona 7-O-metiltransferase e glutathione S-transferase são alguns exemplos de transcritos induzidos. Proteína de controle do tempo de florescimento, lipotransferase plastidial e UDP-glucose glucosiltransferase são exemplos de transcritos reprimidos nessa categoria.

### ***Atividade de quinase***

Um total de 13 transcritos foi agrupado nessa categoria, sendo seis em BGD1 (50% induzido), cinco em BGD2 (20% induzido) e apenas dois em BGD3, sendo um induzido e um reprimido. Quinase cloroplástica, proteína quinase ativada por mitógenos, receptor quinase inativo e adenilil-sulfato cloroplástico são alguns exemplos de transcritos induzidos. Fototropina, Proteína serina-treonina quinase e uma carboxilase sintase são alguns exemplos de transcritos reprimidos.

### ***Atividade de Transportador***

Dos 13 transcritos anotados nessa categoria, quatro foram agrupados em BGD1 (três induzidos), oito em BGD2 (seis induzidos) e apenas um em BGD3, sendo este reprimido. Entre os transcritos induzidos encontram-se transportadores de nucleobase/ascorbato, transporte de lipídeos, canais de cálcio e hidrogênio, entre outras. Entre os transcritos reprimidos foi observada uma proteína de canal iônico, receptor glutamato, proteína de tolerância a metal e canal de sódio e hidrogênio.

### ***Fatores de transcrição***

A maioria dos transcritos anotados nessa categoria foi induzida. Em BGD1, quatro transcritos foram induzidos, sendo dois fatores de transcrição WRKY, um BEL1. Em BGD2, um domínio BEL induzido foi observado e um regulador de reposta PRR95 foi reprimido. Em BGD3, dois transcritos foram induzidos, sendo um fator de transcrição BIM3 e um repressor de RNA polimerase II.

### *Atividade de Receptor*

Um transcrito reprimido foi anotado em BGD1 enquanto que quatro transcritos foram observados em BGD2, sendo três induzidos. BGD3 apresentou um transcrito induzido anotado nessa categoria. Exemplos de transcritos induzidos incluem proteína de ligação a beta-glucan, proteína quinase receptora associada a senescência da folha e uma proteína quinase feronia receptora. Os dois transcritos reprimidos foram uma proteína quinase receptora rica em cisteína e uma fototropina.

### *Atividade de nuclease e Atividade de regulador enzimático*

Dois transcritos foram anotados com atividade de nuclease, sendo induzidos em BGD1. Estes, foram representados por uma ribonuclease E e uma exoribonulcease 5-3. Com relação à categoria de regulador enzimático, dois transcritos foram anotados, sendo uma proteína reguladora de ribonuclease, induzida em BGD1, e uma reprimida em BGD2.

A figura 12 sumariza o perfil transcricional das funções moleculares entre as BGDs.

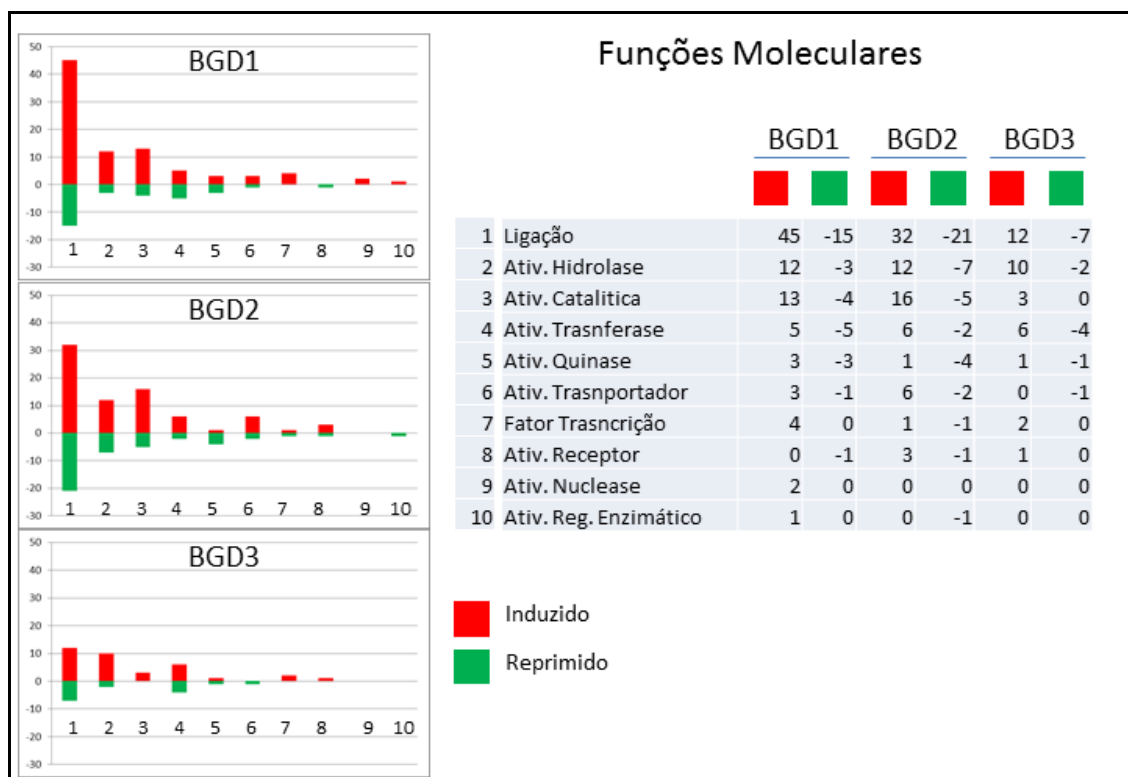


Figura 12 - Distribuição dos transcritos induzidos e reprimidos de cada Biblioteca de Genes Diferenciais (BGD), agrupados em funções moleculares. BGD1: Biblioteca de Genes Diferenciais obtidos entre 3 e 6 horas após a inoculação. BGD2: Biblioteca de Genes Diferenciais obtidos entre 12 e 24 horas após a inoculação. BGD3: Biblioteca de Genes Diferenciais obtidos entre 48 e 96 horas após a inoculação.

## 6.4 - Discussão

Os mecanismos de resistência estabelecidos podem variar de acordo com o patossistema em estudo, e considerando o caso de fungos biotróficos, como *P. pachyrhizi*, a dependência de células vivas do hospedeiro para o completo ciclo de vida do microrganismo, demanda uma complexa inter-relação parasitária.

O gênero *Phaseolus* se caracteriza como hospedeiro alternativo para *P. pachyrhizi*, sendo que o feijão-lima (*P. lunatus*) tem se apresentado como uma fonte mais resistente do que a soja. Este é caracterizado por necroses teciduais e praticamente ausência de esporulação, quando infectado pelo fungo (LYNCH *et al.*, 2006; BONDE *et al.*, 2008). Por essa razão, caracterizar os eventos de pré-penetração e penetração do fungo, e a identificação de genes atuantes no processo de defesa da planta em diferentes patossistemas, abre alternativas para a identificação de componentes de resistência frente ao patógeno.

O aparecimento de lesões em *P. lunatus* observadas em nosso estudo corroboram os dados apresentados por LYNCH *et al.* (2006) e BONDE *et al.* (2008), que verificaram lesões do tipo RB com uma pequena esporulação em *P. lunatus*. Todavia, em nosso estudo não foi observada a formação de urédia nas lesões em *P. lunatus* e nem a ocorrência de esporulação, indicando que mecanismos mais tardios pós-penetração devem estar atuando impedindo que o fungo complete o ciclo.

Em todos os genótipos avaliados, esporos de *P. pachyrhizi* germinaram e houve formação de apressório a 6 hai. Embora não tenha ocorrido diferença no percentual de germinação dos esporos entre as espécies, foi observado diferença na formação do apressório. A cultivar de soja Embrapa 48 apresentou maior percentagem de formação de apressórios nas horas iniciais após a inoculação enquanto que o genótipo de soja PI 230970 apresentou o menor percentual. Esses dados condizem com a característica de cada um dos genótipos, associados à suscetibilidade e resistência a *P. pachyrhizi*, respectivamente. *Phaseolus lunatus* apresentou perfil intermediário entre os dois genótipos de soja citados, porém a partir de 12 hai, o percentual de germinação foi equivalente ao genótipo de soja, resistente ao fungo. Um maior percentual na formação de apressórios proporciona um número maior de potenciais sítios de infecção.

A germinação bem como a formação do apressório em *P. pachyrhizi* apresenta resposta tigmotrópica (LOEHRER *et al.*, 2008). Isso pode ser observado pela preferência na formação do apressório junto às paredes anticlinais de células adjacentes.

No entanto, observamos que a penetração ocorreu na parede externa da epiderme, próximo à parede transversal. O mesmo fenômeno foi observado por EDWARDS & BONDE (2011), que ainda relataram que a penetração de *P. pachyrhizi* poderia ocorrer por digestão química da cutícula bem como da parede da célula hospedeira, uma vez que não foram observadas deformidades da parede celular infectada. Essas observações reforçam uma atividade química na penetração fúngica. No presente estudo foram observadas projeções do apressório junto à parede externa da epiderme, em proximidade com a parede anticlinal de células adjacentes, sendo que o desenvolvimento do protoplasto apressorial foi acompanhado de alta atividade enzimática, associada à forte coloração exibida pelo corante *coomassie blue*. Isso condiz com os dados apresentados na literatura que inferem sobre uma penetração por atividade química não influenciada pelo tipo de hospedeiro (EDWARDS & BONDE, 2011).

Foi constatado que 6 hai, *P. pachyrhizi* já havia perfurado o tecido vegetal, porém sem a observação de hifas primárias no interior do mesofilo, que foi observada somente a 12 hai. Nas horas subsequentes ocorreu o avanço da colonização do fungo, com abundante presença de hifas 72 hai. Isso demonstra que o fungo foi eficaz em estabelecer a penetração, suportando os mecanismos de defesa primária produzidos pelo tecido vegetal.

Os eventos de desenvolvimento e penetração do fungo mostraram uma relação com os transcritos diferencialmente expressos na folha de *P. lunatus* durante interação com o patógeno. Entre 3 e 6 hai (BGD1) o fungo promove a germinação e formação do apressório na superfície foliar. Esse mesmo período foi marcado por uma indução de fatores de transcrição WRKY e proteínas quinases, que estão relacionados em processos de indução de resistência em planta (DU & CHEN, 2000; EULGEM & SOMSSICH, 2007), além da indução de proteínas atuantes em processos de ligação a outras proteínas, ácidos nucleicos, entre outros compostos celulares. Em parte, essa indução pode ser decorrente da atividade química exercida pelo patógeno para perfurar a epiderme foliar, promovendo a percepção de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) que podem atuar como indutores de processos de defesa celular (DANGL & JONES, 2001; JONES & DANGL, 2006). Isso pode explicar o fato de que uma maior quantidade de transcritos diferencialmente expressos foi identificada nas primeiras horas do processo infeccioso de *P. pachyrhizi* em *P. lunatus*. Essa informação foi condizente também com a indução de transcritos relacionado à proteína RER1, que pode ter sua expressão aumentada em tecidos onde a atividade secretora é

provavelmente alta (SATO *et al.*, 1999), o que em parte, reflete uma alta atividade metabólica. Essa indução gênica em horas iniciais também é marcante no patossistema soja-*P. pachyrhizi*. VAN DE MORTEL *et al.* (2007) e SCHNEIDER *et al.* (2011) demonstraram que as horas iniciais do processo infeccioso de *P. pachyrhizi* em plantas de soja são marcadas por uma grande indução gênica na planta, como uma resposta de defesa basal e inespecífica contra o patógeno, sendo induzida por efetores do fungo (MAMPs). No entanto, em estágio de colonização do mesófilo foliar, ocorre uma segunda explosão gênica, sendo mais rápida em genótipos resistentes do que em plantas suscetíveis ao fungo.

Genes atuantes na rota dos fenilpropanóides foram relacionados em todas as três bibliotecas de genes diferenciais de *P. lunatus*. Transcritos apresentando similaridades com fenilalanina amônia liase (PAL), chalcona sintase (CHS), chalcona redutase, isoflavona 2-hydroxilase, 2-hidroxi-isoflavonona sintase tiveram sua expressão induzida durante interação com *P. pachyrhizi*. A maioria dos transcritos envolvidos na rota dos fenilpropanóides foi altamente induzida nas horas iniciais do processo infeccioso. A via dos fenilpropanóides esta envolvida na biossíntese de fitoalexinas, que são constituintes dos fatores de resistência bioquímicos pós-formados (DARVILL & ALBERSHEIM, 1984; DIXON *et al.*, 2002). Interessantemente, essa via de biossíntese é marcante no processo de defesa exibido pela soja contra *P. pachyrhizi*. TREMBLAY *et al.* (2010) relataram que genes da rota dos fenilpropanóides estavam presentes entre os 50 genes mais induzidos em folhas de soja inoculadas com a ferrugem. CHOI *et al.* (2008) também agruparam a via dos fenilpropanóides como uma rota induzida em resposta ao fungo e atuante na manutenção do balanço oxidativo da célula e resposta de resistência. Nos mecanismos de defesa mediados pelo gene *Rpp2* (VAN DE MORTEL *et al.*, 2007) e *Rpp3* (SCHNEIDER *et al.*, 2011) a rota dos fenilpropanóides foi representada por uma resposta bifásica, tendo sua expressão altamente induzida nas horas iniciais e com uma segunda indução por volta de 72 hai.

A hifa primária de infecção foi visualizada 12 hai, relacionando dessa forma com os transcritos diferenciais de BGD2, que foram obtidos entre 12 e 24 horas após a inoculação de *P. pachyrhizi*. Conjunto à presença da hifa de *P. pachyrhizi* foram observados a indução de proteínas PR-1 e PR-10, sendo esta última, uma PR intracelular induzida em todas as BGDs. Essas proteínas apresentam atividade de ribonuclease, devido ao domínio proteico BetV1, e já foram relatadas com atividade antifúngica (NIDERMAN *et al.*, 1995; CHADHA & DAS, 2006). Apesar de não ter sido observado

o haustório por meio das técnicas de microscopia empregadas no presente trabalho, a indução da PR intracelular, em parte, condiz com a presença dessa estrutura fúngica. Para que a proteína PR-10 penetre na hifa e exerça a atividade ribonuclease, é necessário que o patógeno penetre a célula, como relatado por CHADHA & DAS (2006). Além disso, a indução de PR com domínio BetV1 também foram associados a sítios de biossíntese de fenilpropanóides (WARNER *et al.*, 2003) que, como relatado anteriormente, foram induzidos em todas as BGDs analisadas.

Entre outros transcritos induzidos na presença da hifa de *P. pachyrhizi* no interior do mesófilo de *P. lunatus*, foram observados alguns transcritos com similaridade a proteínas ABC (*ATP Binding Cassete*). Essas proteínas atuam no transporte de uma variedade de moléculas através da membrana, seja por importação ou exportação (VERRIER *et al.*, 2008), e PEN3, uma proteína com domínio ABC já foi relatado como componente da resistência não hospedeira à *P. pachyrhizi*, exibida por *Arabidopsis thaliana* (LOEHRER *et al.*, 2008).

O avanço na colonização do mesófilo de *P. lunatus* por hifas de *P. pachyrhizi* foi acompanhado também pela indução de transcritos relacionados a mecanismos diretos de defesa contra fungos. Entre 48 e 96 hai, foi observada a indução de um transcrito associado ao gene SNC1 (*Suppressor of NPR1, constitutive 1*), de *Arabidopsis thaliana*. SNC1 é um gene *R* (gene de Resistência), que regula a indução de outros, como proteínas PR, atuantes no mecanismo de defesa da planta (ZHANG *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2007). Esse gene possui um domínio de ligação a nucleotídeo (NB) e um domínio repetido rico em leucina (LRR) comumente associado a genes de resistência (DANGL & JONES, 2001). A atividade de genes *R* é altamente regulada e a sua interação com componentes de avirulência do patógeno (proteínas Avr) levam à indução de genes atuantes no mecanismo de defesa da planta. Foi demonstrado que SNC1 é dependente da via de sinalização do ácido salicílico, importante componente da indução de defesa frente a fungos biotróficos (THOMMA *et al.*, 2001). Além do mais, SNC1 tem seu nível de transcrição comprometido em genótipos de *Arabidopsis thaliana* mutantes *eds1* e *pad4* (GOU & HUA, 2012). Esses componentes são importantes na resistência não-hospedeira contra *P. pachyrhizi*, exibida por *Arabidopsis thaliana* (LOEHRER *et al.*, 2008) e já foram demonstrados como sendo atuantes na resistência mediada pelo gene *Rpp2* da soja (PANDEY *et al.*, 2011). Junto à indução de SNC1 foram observados transcritos relacionados a proteínas defensinas, proteínas PR-1 e PR-10, endoquitinases e 1,3-beta glucanases, que também são classificadas como proteínas relacionadas à

patogenicidade (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999). Defensinas atuam diretamente sobre a hifa, promovendo um fluxo de íons através da membrana, alterando sua permeabilidade e dessa forma exercendo atividade antifúngica (THEVISSSEN *et al.*, 1999). Beta 1,3, glucanases e endochitinases também expressam sua ação antifúngica, promovendo a quebra de beta-glucan e quitina, que são os maiores componentes da parede celular do fungo (SELA-BUURLAGE *et al.*, 1993; COLLINGE *et al.*, 2008). A figura 13 sumariza os eventos correlacionados entre o processo de penetração de *P. pachyrhizi* e as principais respostas de defesa da planta.

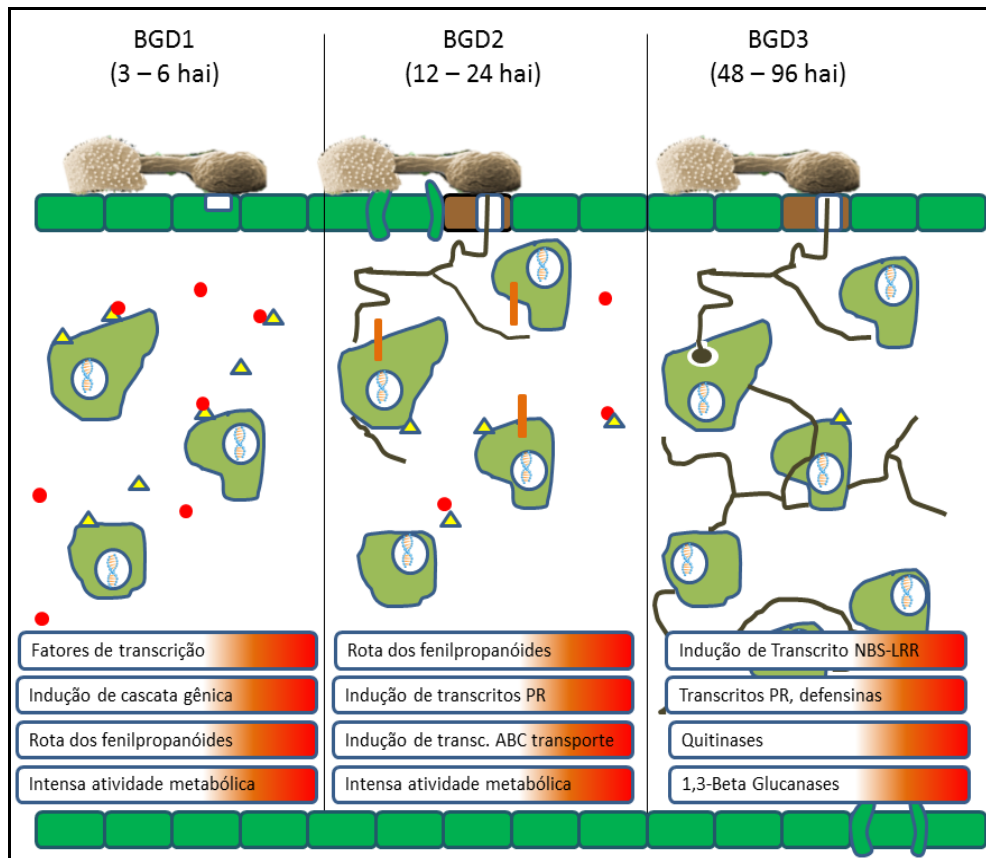


Figura 13 – Ilustração do processo de penetração de *Phakopsora pachyrhizi* em folhas de *Phaseolus lunatus* e a correlação dos principais processo de defesa entre 3 e 96 horas após a inoculação. O reconhecimento dos efetores (círculos vermelhos) pelos receptores (triângulos amarelos) desencadeia uma resposta de defesa já nas horas iniciais do processo infeccioso (3 a 6 horas após a inoculação). Com o avanço da penetração de *P. pachyrhizi*, transcritos associados a genes com ação antifúngica são induzidos, demonstrando que *P. lunatus* atua diretamente contra o fungo.

Dessa forma, com base nos transcritos diferencialmente expressos, foi possível identificar importantes componentes do mecanismo de defesa de *P. lunatus*, uma fonte alternativa de resistência à ferrugem asiática. Como observado, a planta responde diretamente às etapas de colonização do patógeno, promovendo a indução de transcritos que a princípio, apresentam um perfil de atuação direta sobre componentes estruturais do fungo, numa defesa pós-haustorial.

## 6.5 - Perspectivas

A inferência sobre os mecanismos de defesa de *P. lunatus* contra o fungo *P. pachyrhizi* foi baseada exclusivamente em transcritos diferencialmente expressos que receberam anotação gênica automática. No entanto, um total de 290 transcritos, que corresponde a 47% dos transcritos diferenciais, não foi considerado nessa análise preliminar. Isso reflete um potencial gênico a ser explorado, que ainda não foi caracterizado, e que por ventura, pode conter potenciais transcritos e rotas metabólicas envolvidas na defesa contra *P. pachyrhizi*.

Etapas referentes à identificação de domínios proteicos, rotas metabólicas, identificação de regiões promotoras e estratégias de genômica funcional são campos a serem analisados, com o intuito de elucidar o transcriptoma induzido de feijão-lima e assim, tentar compreender quais os componentes de defesa atuantes, nessa fonte alternativa de resistência à *P. pachyrhizi*. Estes genes podem vir a ser utilizados em programas de melhoramento, por meio de técnicas de engenharia genética, para obtenção de cultivares com resistência genética efetiva contra a ferrugem asiática da soja.

## 6.6 – Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, n. 10, p. R106, 2010.
- BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BERNER, D. K.; FREDERICK, R. D.; MOORE, W. F.; LITTLE, S. Comparative Susceptibilities of Legume Species to Infection by *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, v. 92, n. 1, p. 30-36, 2008.
- BROMFIELD, K.; HARTWIG, E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, n. 2, p. 254-255, 1980.
- CARBON, S.; IRELAND, A.; MUNGALL, C. J.; SHU, S.; MARSHALL, B.; LEWIS, S. AmiGO: online access to ontology and annotation data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 2, p. 288-289, 2009.
- CHADHA, P.; DAS, R. H. A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. **Planta**, v. 225, n. 1, p. 213-222, 2006.
- CHOI, J. J.; ALKHAROUF, N. W.; SCHNEIDER, K. T.; MATTHEWS, B. F.; FREDERICK, R. D. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases. **Functional and Integrative Genomics**, v. 8, n. 4, p. 341-359, 2008.
- COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, J. D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 31-40, 2008.
- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. *Blast2GO*: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 826-833, 2001.
- DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors-a defense against microbial infection in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, n. 1, p. 243-275, 1984.
- DIXON, R. A.; ACHNINE, L.; KOTA, P.; LIU, C. J.; REDDY, M.; WANG, L. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 5, p. 371-390, 2002.
- DU, L.; CHEN, Z. Identification of genes encoding receptor - like protein kinases as possible targets of pathogen - and salicylic acid - induced WRKY DNA - binding proteins in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 24, n. 6, p. 837-847, 2000.
- EDWARDS, H. H.; BONDE, M. R. Penetration and establishment of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean leaves as observed by transmission electron microscopy. **Phytopathology**, v. 101, n. 7, p. 894-900, 2011.
- EULGEM, T.; SOMSSICH, I. E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 366-371, 2007.
- GARCIA, A.; CALVO, E. S.; DE SOUZA KIIHL, R. A.; HARADA, A.; HIROMOTO, D. M.; VIEIRA, L. G. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 545-553, 2008.
- GÖTZ, S.; GARCÍA-GOMÉZ, J. M.; TEROL, J.; WILLIAMS, T. D.; NAGARAJ, S. H.; NUEDA, M. J.; ROBLES, M.; TALÓN, M.; DOPAZO, J.; CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the *Blast2GO* suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420-3435, 2008.
- GOU, M.; HUA, J. Complex regulation of an R gene SNC1 revealed by auto-immune mutants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 2, p. 213-216, 2012.
- GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644-652, 2011.
- HARTWIG, E.; BROMFIELD, K. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 23, n. 2, p. 237-239, 1983.
- HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, v. 26, n. 6, p. 1135-1136, 1986.
- HENNINGS, P. Some new Japanese uredinales. IV. **Hedwigia (Suppl.)**, p. 107-108, 1903.
- JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. **New York: McGraw-hill Book**, 1940.
- JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

- LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 323, 2011.
- LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, n. 1, p. 133-142, 2012.
- LI, Y.; YANG, S.; YANG, H.; HUA, J. The TIR-NB-LRR gene SNC1 is regulated at the transcript level by multiple factors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 11, p. 1449-1456, 2007.
- LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; GOELLNER, K.; CONRATH, U.; SCHAFFRATH, U. Characterization of nonhost resistance of Arabidopsis to the Asian soybean rust. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 11, p. 1421-1430, 2008.
- LYNCH, T. N.; MAROIS, J. J.; WRIGHT, D. L.; HARMON, P. F.; HARMON, C. L.; MILES, M. R. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on *Phaseolus* spp. in the United States. **Plant Disease**, v. 90, p. 970, 2006.
- MAGNANI, E. B. Z.; ALVES, E.; ARAÚJO, D. V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 156-160, 2007.
- MCLEAN, R.; BYTH, D. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Crop and Pasture Science**, v. 31, n. 5, p. 951-956, 1980.
- MILES, M. R.; PASTOR-CORRALES, M. A.; HARTMAN, G. L.; FREDERICK, R. D. Differential Response of Common Bean Cultivars to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, v. 91, n. 6, p. 698-704, 2007.
- NIDERMAN, T.; GENETET, I.; BRUYERE, T.; GEES, R.; STINTZI, A.; LEGRAND, M.; FRITIG, B.; MOSINGER, E. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal (isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*). **Plant Physiology**, v. 108, n. 1, p. 17-27, 1995.
- OGLE, H.; BYTH, D.; MCLEAN, R. Effect of rust (*Phakopsora pachyrhizi*) on soybean yield and quality in south-eastern Queensland. **Crop and Pasture Science**, v. 30, n. 5, p. 883-893, 1979.
- PANDEY, A. K. et al. Functional analysis of the asian soybean rust resistance pathway mediated by *Rpp2*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 2, p. 194-206, 2011.
- RAY, J. D.; MOREL, W.; SMITH, J. R.; FREDERICK, R. D.; MILES, M. R. Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 and PI 587880A. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 2, p. 271-280, 2009.
- ROSSI, R. First report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the province of Misiones, Argentina. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 102-102, 2003.
- SATO, K.; UEDA, T.; NAKANO, A. The *Arabidopsis thaliana* RER1 gene family: its potential role in the endoplasmic reticulum localization of membrane proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 41, n. 6, p. 815-824, 1999.
- SCHNEIDER, K. T.; VAN DE MORTEL, M.; BANCROFT, T. J.; BRAUN, E.; NETTLETON, D.; NELSON, R. T.; FREDERICK, R. D.; BAUM, T. J.; GRAHAM, M. A.; WHITHAM, S. A. Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlate with fungal penetration and haustoria formation. **Plant Physiol**, v. 157, n. 1, p. 355-371, 2011.
- SCHNEIDER, R. W.; HOLLIER, C. A.; WHITAM, H. K.; PALM, M. E.; MCKEMY, J. M.; HERNÁNDEZ, J. R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. First Report of Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the Continental United States. **Plant Disease**, v. 89, n. 7, p. 774-774, 2005.
- SELA-BUURLAGE, M. B.; PONSTEIN, A. S.; BRES-VLOEMANS, S. A.; MELCHERS, L. S.; VAN DEN ELZEN, P. J.; CORNELISSEN, B. J. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and [beta]-1, 3-glucanases exhibit antifungal activity. **Plant Physiology**, v. 101, n. 3, p. 857-863, 1993.
- SINCLAIR, J. Threats to soybean production in the tropics: red leaf blotch and leaf rust. **Red**, v. 1, p. 1, 1989.
- SLAMINKO, T. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; BONDE, M. R.; HARTMAN, G. L. New Legume Hosts of *Phakopsora pachyrhizi* Based on Greenhouse Evaluations. **Plant Disease**, v. 92, n. 5, p. 767-771, 2008.
- SORIA-GUERRA, R. E.; ROSALES-MENDOZA, S.; CHANG, S.; HAUDENSHIELD, J. S.; PADMANABAN, A.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; HARTMAN, G. L.; GHABRIAL, S. A.; KORBAN, S. S. Transcriptome analysis of resistant and susceptible genotypes of *Glycine tomentella* during *Phakopsora pachyrhizi* infection reveals novel rust resistance genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, n. 7, p. 1315-1333, 2010.

- STEWART, S.; GUILLIN, E.; DÍAZ, L. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in Uruguay. **Plant Disease**, v. 89, n. 8, p. 909-909, 2005.
- THEVISSSEN, K.; TERRAS, F. R.; BROEKAERT, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5451-5458, 1999.
- THOMMA, B. P.; PENNINGCKX, I. A.; CAMMUE, B.; BROEKAERT, W. F. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, n. 1, p. 63-68, 2001.
- TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N. W.; LI, S.; MATTHEWS, B. F. Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 183-193, 2010.
- TWIZEYIMANA, M.; HARTMAN, G. L. Culturing *Phakopsora pachyrhizi* on Detached Leaves and Urediniospore Survival at Different Temperatures and Relative Humidities. **Plant Disease**, v. 94, n. 12, p. 1453-1460, 2010.
- UPPALAPATI, S. R. et al. Loss of abaxial leaf epicuticular wax in *Medicago truncatula* *irg1/palm1* mutants results in reduced spore differentiation of anthracnose and nonhost rust pathogens. **Plant Cell**, v. 24, n. 1, p. 353-370, 2012.
- VAN DE MORTEL, M.; RECKNOR, J. C.; GRAHAM, M. A.; NETTLETON, D.; DITTMAN, J. D.; NELSON, R. T.; GODOY, C. V.; ABDELNOOR, R. V.; ALMEIDA, Á. M. R.; BAUM, T. J. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 8, p. 887-899, 2007.
- VAN LOON, L.; VAN STRIEN, E. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.
- VERRIER, P. J.; BIRD, D.; BURLA, B.; DASSA, E.; FORESTIER, C.; GEISLER, M.; KLEIN, M.; KOLUKISA OGLU, U.; LEE, Y.; MARTINOIA, E.; MURPHY, A.; REA, P. A.; SAMUELS, L.; SCHULZ, B.; SPALDING, E. P.; YAZAKI, K.; THEODOULO, F. L.. Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 4, p. 151-159, 2008.
- WARNER, S. A.; GILL, A.; DRAPER, J. The developmental expression of the asparagus intracellular PR protein (AoPR1) gene correlates with sites of phenylpropanoid biosynthesis. **The Plant Journal**, v. 6, n. 1, p. 31-43, 2003.
- WOLF, G.; FRIC, F. A rapid method for staining *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in and on whole barley leaves with a protein-specific dye. **Phytopathology**, v. 71, p. 596-598, 1981.
- YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. E.; GODOY, C. V.; NUNES, J. Epidemics of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 675-677, 2005.
- ZHANG, Y.; GORITSCHNIG, S.; DONG, X.; LI, X. A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in suppressor of *npr1-1*, constitutive 1. **The Plant Cell Online**, v. 15, n. 11, p. 2636-2646, 2003.